ELENA POPA

CHIMIE BIOORGANICĂ

Editura Universității din Bucureşti

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ELENA POPA

CHIMIE BIOORGANICĂ

EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI
2004

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Referenți științifici: Prof. dr. ADALGIZA CIOBANU
Prof. dr. ANCA NICOLAE

652/12

Biblioteca Centrală Universitară
" Carol I " Bucureşti
Cota IV 521 275

© Editura Universității din București
Şos. Panduri, 90-92, București - 050663; Telefon/Fax: 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Culegere și tehnoredactare computerizată: *DANIELA VERONICA GHICA*

B.C.U. "CAROL I" BUCURESTI
C20126721

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
POPA, ELENA
Chimie bioorganică / Elena Popa – București: Editura Universității din București, 2004
Bibliogr.
ISBN 973-575-927-6

54-3:547(075.8)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

PREFAȚĂ

În peisajul modern complex şi dinamic al ştiinţelor naturii, interdisciplinaritatea s-a impus ca principiu şi instrument de lucru.

Este aproape de la sine înţeles că descifrarea, elucidarea şi interpretarea fenomenelor naturale nu mai este astăzi apanajul oamenilor de ştiinţă izolaţi ermetic în specializări înguste.

Dată fiind biodiversitatea infinită a lumii vii, ca şi multitudinea de aspecte care o caracterizează, investigarea acesteia aduce astăzi la un loc specialişti din domenii diferite dar conexe (chimişti, biologi, farmacişti, biochimişti, fizicieni, informaticieni, medici, biofizicieni).

Deoarece prezentul şi viitorul aparţin unor conexiuni interdisciplinare, studenţii care se pregătesc astăzi pentru a deveni buni cercetători sau cadre didactice trebuie instruiţi în sensul unor asemenea colaborări.

În consecinţă, am considerat că un curs de Chimie Bioorganică este binevenit, contribuind la lărgirea perspectivelor pregătirii tinerilor care studiază în cadrul unor specializări înrudite.

Cartea de faţă tratează ea însăşi un domeniu interdisciplinar, în care prezentând structura şi proprietăţile celor patru clase de biomolecule organice (glucide, lipide, proteine, acizi nucleici) componente ale materiei vii din perspectiva legăturii cu rolul lor biologic, se oferă studenţilor un instrument de înţelegere, abordare şi explicare logică a fenomenelor complexe implicate în metabolismul celular.

Actuala lucrare nu pretinde a descifra în întregime multitudinea de aspecte (multe dintre ele dealtfel încă necunoscute) ale comportării biomoleculelor organice, dar reprezintă pentru studenţi o iniţiere în această direcţie.

Cartea se recomandă studenţilor, masteranzilor, doctoranzilor şi tinerelor cadre didactice care se instruiesc şi lucrează în domenii ca: Chimie Organică, Chimie Ecologică, Biochimie, Biologie, Farmacie, Fizică Medicală, Biofizică.

Menţionez că această lucrare este rezultatul activităţii de predare a disciplinei de Chimie Bioorganică la secţia Chimia Mediului din Facultatea de Chimie şi la secţiile de Biofizică şi Fizică Medicală de la Facultatea de Fizică, din cadrul Universităţii Bucureşti.

Conf. Dr. Elena Popa

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CUPRINS

Pag.

PREFAȚĂ

Introducere 1

I. GLUCIDE 3
I.1.Clasificare 3
I.2.Monoglucide 5
I.2.1. Structură 5
I.2.1.1. Oze epimere 6
I.2.1.2. Structuri ciclice 6
I.2.1.3. Mutarotația 10
I.2.2. Reacții chimice ale monoglucidelor 11
I.2.2.1. Proprietăți datorate prezenței grupelor carbonil 11
I.2.2.2. Proprietăți datorate prezenței grupelor hidroxil 17
I.2.2.3. Reacții de interconversie 19
I.2.2.4. Alte reacții caracteristice monoglucidelor 22
I.2.3. Compuși înrudiți cu ozele 23
I.2.3.1. Vitamina C 23
I.2.3.2. Vitamina B_2 25
I.2.3.3. Aminoglucide 26
I.2.3.4. Glicozide 28
I.3. Oliglucide 28
I.3.1. Diglucide 28
I.3.1.1. Zaharoza 29
I.3.1.2. Maltoza 31
I.3.1.3. Celobioza 32
I.3.1.4. Lactoza 33
I.3.2. Alte oligoglucide 34
I.4. Poliglucide 36
I.4.1. Poliglucide structurale 36
I.4.1.1. Poliglucide structurale din regnul vegetal 36
I.4.1.2. Poliglucide structurale din regnul animal 41
I.4.2. Poliglucide de rezervă 42
I.4.2.1. Poliglucide de rezervă din regnul vegetal 42
I.4.2.2. Poliglucide de rezervă din regnul animal 48
I.5. Transformările biochimice ale glucidelor 50
I.5.1. Fotosinteza 50
I.5.2. Fermentația alcoolică 53
I.5.3. Glicoliza 55

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II. AMINOACIZI. PEPTIDE. PROTEINE 59
II.1. Aminoacizi 59
II.1.1. Generalități 59
II.1.2. Nomenclatură, clasificare 59
II.1.2.1. Aminoacizii naturali "standard" 60
II.1.2.2. Aminoacizi "nestandardizați" din unele proteine 62
II.1.2.3. Aminoacizi "nestandardizați" neconstituenți ai proteinelor 64
II.1.3. Metode de obținere 66
II.1.3.1. Metode de sinteze chimice organice 66
II.1.3.2. Metode biochimice de obținere 70
II.1.4. Proprietăți fizice ale α-aminoacizilor 73
II.1.5. Proprietăți chimice ale α-aminoacizilor 75
II.1.5.1. Proprietăți chimice datorate prezenței grupei NH_2 75
II.1.5.2. Reacții specifice grupei COOH 76
II.1.5.3. Reacții datorate prezenței ambelor grupe funcționale la C_α 76
II.1.5.4. Reacții datorate radicalilor R 78
II.1.6. Transformări biochimice ale α-aminoacizilor 79
II.1.6.1. Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor 79
II.1.6.2. Transaminarea 81
II.1.6.3. Reacții de decarboxilare 82
II.1.6.4. Dezaminarea şi decarboxilarea simultane 84
II.1.6.5. Alte transformări biochimice ale aminoacizilor 84
II.2. Peptide 85
II.2.1. Structura primară a peptidelor 86
Determinarea structurii primare a peptidelor şi proteinelor 88
II.2.2. Proprietățile fizice ale peptidelor 96
II.2.3. Proprietățile chimice ale peptidelor 97
II.2.4. Peptide naturale 98
II.2.4.1. Peptide neproteice izolate din țesuturi animale şi vegetale 99
II.2.4.2. Peptide neproteice cu acțiune antibiotică 101
II.2.4.3. Peptide toxice 105
II.3. Proteine 106
II.3.1. Clasificare 107
II.3.2. Structura proteinelor 107
II.3.2.1. Structura primară 108
II.3.2.2. Structura secundară a proteinelor 109
II.3.2.3. Structura terțiară a proteinelor 115
II.3.2.4. Structura cuaternară a proteinelor 116
II.3.3. Proprietățile fizice ale proteinelor 117
II.3.3.1. Solubilitatea 117

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.3.3.2. Punctul izoelectric 118
II.3.3.3. Influența tăriei ionice a mediului 119
II.3.3.4. Agenți denaturanți 119
II.3.3.5. Proprietăți optice 120
II.3.3.6. Spectre de absorbție 120
II.3.4. Proprietățile chimice ale proteinelor 120
II.3.4.1. Reacția xantoproteică 120
II.3.4.2. Reacția Miller 121
II.3.4.3. Reacția Pauly 121
II.3.4.4. Reacția cu ninhidrină 121
II.3.4.5. Reacția biuretului 121
II.3.5. Proprietăți imunologice ale proteinelor 122
II.3.6. Câteva clase de proteine 124
II.3.6.1. Holoproteine 124
II.3.6.2. Heteroproteine 128
II.3.6.3. Proteine toxice 136
II.3.6.4. Enzime 137
II.3.6.5. Proteine de transport 149

III. LIPIDE 154
III.1. Clasificarea lipidelor după criteriul biologic 154
III.1.1. Lipide de constituție 154
III.1.2. Lipide de rezervă 155
III.2. Componente principale ale moleculelor lipidelor 156
III.2.1. Acizi grași constituenți ai lipidelor 156
Surse biologice 156
III.2.2. Alcooli constituenți ai lipidelor 159
III.3. Clasificare după criteriul chimic (structural) 160
III.3.1. Homolipide 161
III.3.1.1. Gliceride 161
III.3.1.2. Glicozilacilgliceroli 163
III.3.1.3. Ceride 163
III.3.1.4. Etolide 165
III.3.1.5. Steride 165
III. 3.2. Heterolipide (lipide complexe) 167
III.3.2.1. Glicerofosfolipide (Fosfogliceride) 167
III.3.2.2. Sfingolipide 175
III.4. Lipide nesaponificabile 177
III.4.1. Steroide 177
Steroli 178
III.4.2. Acizi biliari 180

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III.5. Aspecte legate de rolul biologic al lipidelor 182
III.5.1. Lipoproteinele plasmatice 182
III.5.2. Digestia lipidelor 185

IV. ACIZI NUCLEICI 188
IV.1. Compoziția chimică a acizilor nucleici 189
IV.1.1. Baze organice azotate 191
IV.1.2. Nucleoside 193
IV.1.3. Nucleotide 196
IV.1.3.1. Mononucleotide aciclice 196
IV.1.3.2. Mononucleotide ciclice 199
IV.1.3.3. Derivați nucleotidici 200
IV.1.3.4. Nucleotid-coenzime 202
IV.2. Acizii deoxiribonucleici (ADN) 209
IV.2.1. Structura primară a ADN 211
IV.2.2. Structura secundară a ADN 213
IV.2.3. Structura terțiară a ADN 216
IV.2.4. Structura cuaternară a ADN 218
IV.2.5. Tipuri de ADN 219
IV.2.5.1. ADN cu dextrorotație 220
IV.2.5.2. ADN cu senestrorotație 223
IV.2.5.3. ADN bicatenari ciclici cu molecule întrepătrunse 224
IV.2.6. Replicarea ADN 224
IV.3. Acizii ribonucleici (ARN) 227
IV.3.1. Structura primară a ARN 229
IV.3.2. Structura secundară a ARN 230
IV.3.3. Structura terțiară a ARN 232
IV.3.4. Tipuri de ARN 233
IV.3.4.1. ARN mesager (ARNm) 234
IV.3.4.2. ARN de transfer (ARNt) 238
IV.3.4.3. ARN ribozomali (ARNr) 240
IV.3.5. Biosinteza proteinelor 241
IV.3.5.1. Codul genetic 242
IV.3.5.2. Etapele biosintezei proteinelor 244

BIBLIOGRAFIE 248

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

CHIMIE BIOORGANICĂ

Introducere

Biomoleculele au apărut ca produşi ai selecţiei evolutive de pe planeta noastră; forma, tipul şi dimensiunile acestora determină atât specificitatea lor biologică, cât şi dimensiunile celulelor vii şi ale organitelor celulare.

La baza structurării organismelor vii stau patru tipuri de biomolecule:

- glucidele;
- aminoacizii şi proteinele;
- lipidele;
- acizii nucleici.

Aceste categorii de compuşi, esenţiali pentru apariţia şi evoluţia materiei vii, sunt studiate de către disciplina de Chimie Bioorganică din punctul de vedere al structurii lor şi al acelor proprietăţi care sunt legate direct de rolurile lor biologice.

Biomoleculele care compun organismele vii sunt ierarhizate în ordinea crescândă a complexităţii lor structurale. Astfel, la baza scării evolutive se plasează precursorii simpli prezenţi pe planetă, în mediul înconjurător, care au mase moleculare cuprinse în domeniul 18 – 44: CO_2, H_2O, N_2. În urma reacţiilor acestor precursori se formează intermediari metabolici cu mase moleculare de 50 – 250.

Nivelul superior imediat următor aparţine biomoleculelor cu masă moleculară intermediară (100 – 350): mononucleotide, aminoacizi, mono- şi oligoglucide, acizi graşi, glicerină. Acestea sunt componentele constitutive (structurale) ale biomoleculelor macromoleculare (cu mase de 10^3 – 10^9): acizi nucleici, proteine, poliglucide, lipide.

Biomoleculele macromoleculare se asamblează între ele, formând complexe supramoleculare în care, spre deosebire de nivelele precedente, componenţii sunt asociaţi prin intermediul unor legături necovalente (legături de hidrogen, nepolare, ionice, van der Waals etc.). Asemenea asocieri sunt prezente în: lipoproteine, nucleoproteine, glicolipide etc.

Deşi tăria legăturilor dintre componenţii complexelor supramoleculare este relativ joasă în comparaţie cu cea a legăturilor covalente, totuşi numărul lor mare asigură stabilitatea şi specificitatea asocierilor respective.

Următorul nivel evolutiv de organizare a materiei vii constă în asocierea complexelor supramoleculare (tot prin intermediul unor interacţii necovalente), cu formarea organitelor celulare (nuclee, mitocondrii, cloroplaste, microcorpi, vacuole, lizozomi etc.).

În fine, prin asamblarea organitelor celulare rezultă celulele, nivelul cel mai evoluat de structurare a organismelor vii.

Deşi de la începuturi şi până în prezent, evoluţia materiei vii a cunoscut grade superioare de diversificare şi specializare, cercetările au arătat că iniţial, celulele vii apărute pe planeta noastră au fost formate din cel mult 30 de molecule organice diferite, denumite biomolecule primordiale (20 de α-aminoacizi, 5 nucleobaze, un acid gras, două glucide, glicerină şi colină).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Mai mult decât atât, descoperirea şi studierea codului genetic a permis să se evidenţieze faptul că primele celule vii au folosit de fapt doar 16 aminoacizi naturali, componenţi ai proteinelor. Biomoleculele primordiale reprezintă deci strămoşii ancestrali ai celor patru clase de biomolecule.

Deşi pe scara evolutivă a organismelor vii au apărut noi biomolecule, mai complexe şi mai evoluate din punct de vedere structural, s-a demonstrat că toate acestea sunt în ultimă instanţă derivaţi metabolici şi structurali ai celor 30 de biomolecule constitutive primordiale, formaţi după biosinteza acestora, prin modificările lor chimice dictate de gradul de specializare a organismelor respective.

După rolul lor biologic, cele patru tipuri de biomolecule macromoleculare au funcţii identice în toate speciile de celule.

Astfel, acizii nucleici stochează şi transmit informaţia genetică necesară replicării celulare şi biosintezei proteinelor specifice.

Proteinele sunt produşi direcţi şi efectori ai acţiunii genelor, în care se încorporează informaţia genetică. Dintre toate biomoleculele, proteinele având cea mai mare variabilitate, determină funcţiile biologice ale celulelor. Astfel, unele au rol structural, altule sunt enzime sau hormoni, proteine de transport sau contractile etc.

Poliglucidele au două funcţii biologice majore: sunt substanţe de rezervă bogate în energie, necesare pentru activarea reacţiilor metabolice (amidon, glicogen) sau reprezintă elemente de structurare a celulelor (celuloza, chitina etc.).

În fine, lipidele au şi ele un rol dublu asemănător glucidelor: componente structurale majore ale membranelor biologice şi formă de stocare a energiei potenţiale metabolice, superioară celei a glucidelor şi proteinelor.

Din cele expuse, se poate trage concluzia că biomoleculele macromoleculare mai pot fi sistematizate şi după criteriul informaţional. Astfel, acizii nucleici şi proteinele, care înglobează informaţia genetică, sunt molecule informaţionale, pe când poliglucidele şi lipidele sunt molecule noninformaţionale, dar cu rol extrem de important (structural şi ca furnizori de energie vitală).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I. GLUCIDE

Glucidele (sau zaharurile) reprezintă una dintre cele patru categorii de biomolecule cu importanță deosebită, prezente în organismele vii.

Alături de lipide, glucidele constituie rezerve ale organismelor (glicogenul din mușchii animalelor, amidonul din semințe și tuberculi etc.), ca și elemente constitutive, de strucurare pentru membranele celulare sau pentru cuticula insectelor. În natură se găsesc atât in stare liberă cât și legate cu proteine.

Denumirea lor inițială de "hidrați de carbon" a fost determinată de observația că foarte mulți termeni reprezentativi ai clasei se încadrează în formula generală $C_n(H_2O)_m$, deși, ulterior s-au descoperit și derivați care nu corespund strict acesteia, dar ale căror proprietăți generale și funcții biologice îi plasează în clasa glucidelor.

Termenul de "zaharuri", utilizat și astăzi destul de frecvent, provine de la denumirea grecească a zahărului (sakkaron); zahărul de trestie a fost introdus în Europa în anul 1492, o sursă naturală alternativă devenind ulterior sfecla de zahăr.

Biosinteza glucidelor are loc în plantele verzi, prin procesul de fotosinteză, care utilizează ca precursori dioxidul de carbon și apa, prezenți în natură. Fotosinteza este în sine un proces chimic termodinamic defavorizat, din care cauză nu poate avea loc decât în prezența radiațiilor luminoase și a clorofilei din plante:

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightleftharpoons[\text{- energie}]{h\nu/\text{clorofilă}} C_6(H_2O)_6 + 6O_2$$

Această biosinteză care decurge în condiții anaerobe, cu consum de energie, este un exemplu de reacție anabolică (în urma căreia, din molecule relativ simple se formează edificii moleculare complexe, care stau la baza apariției ființelor vii).

Procesul invers, care are loc cu degajare de energie, reprezintă "arderea" glucidelor în organismele animale și explică de ce zaharurile reprezintă o sursă de energie metabolică pentru acestea. Acest proces este aerob și constituie un exemplu de reacție catabolică (constând în transformarea compușilor organici complecși în molecule relativ simple).

Organismele animale își procură cea mai mare parte din glucidele necesare pe cale exogenă (din plantele introduse în alimentație) și doar o mică parte pe cale endogenă (prin biosinteză din precursori reacționali).

Aceasta explică de ce în plante glucidele reprezintă o pondere de 50-80% (raportată la materialul uscat), în timp ce în regnul animal (cu excepția unor nevertebrate) se găsesc în proporție de 1 – 5%.

I.1. Clasificare

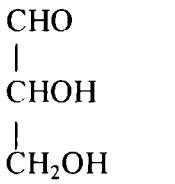
Există mai multe criterii de clasificare a glucidelor.

Monoglucidele sunt polihidroxialdehide sau polihidroxicetone cu structură aciclică sau semiacetalică și care prin hidroliză se transformă în unități mai mici.

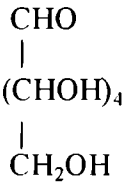
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Monozaharidele se pot clasifica nu numai în funcție de natura grupei carboxil din molecule (în aldoze şi cetoze), dar şi după numărul total de atomi de carbon din moleculă (în trioze, tetroze, pentoze, hexoze).

Astfel, aldehida glicerică, cea mai simplă aldoză, este o aldotrioză, în timp ce glucoza este un reprezentant al aldohexozelor:

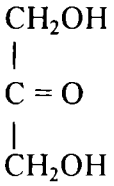


Aldotrioză
(Aldehidă glicerică)

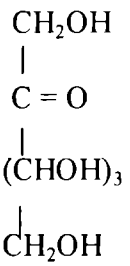


(Aldohexoză)

Dihidroxicetona este cea mai simplă cetoză (cetotrioză), pe când fructoza face parte din categoria cetohexozelor):



Cetotrioză
(Dihidroxiacetona)



Cetohexoză

Oligozaharidele au molecule formate din 2 – 10 resturi de monoglucide unite prin legături eterice la care participă grupele semiacetalice provenite din ciclizarea internă a funcțiilor carbonilice de pe resturile de monoglucide. Prin hidroliză chimică sau enzimatică, ele se transformă în monoglucidele de la care provin. De aceea, oligoglucidele sunt clasificate după numărul de molecule de monoglucide rezultate la hidroliză: dizaharide (ca zahărul de trestie sau de sfeclă), trizaharide, tetrazaharide etc.

În fine, polizaharidele sunt compuşi macromoleculari formați din peste 10 unități de monoglucide, unite prin legături eterice. La hidroliză totală, catalizată de acizi sau de enzime specifice, polizaharidele se transformă în monoglucidele din care provin.

Poliglucidele (polizaharidele) se mai cunosc şi sub denumirea de glicani.

După criteriul chimic, poliglucidele pot fi:

- homopoliglucide (formate dintr-un singur tip de monoglucide) şi
- heteropoliglucide (formate din diferite tipuri de monoglucide).

La rândul lor, homopoliglucidele pot fi clasificate după:

- natura monoglucidului din care se compun (glucozani, manani, arabani, fructozani etc.) sau
- după numărul de atomi de carbon din resturile de monoglucid din care sunt formate: pentozani (ca arabanii sau xilanii), hexozani (ca glucozanii, mananii, galactanii).

Un alt mod de clasificare împarte glucidele în oze şi ozide.

- Ozele sunt de fapt monoglucide, cu molecule lineare sau ciclice, care conțin atomi de C, H şi O.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Ozidele cuprind la rândul lor două subclase:
  - holozidele, formate numai din molecule de oze. În această categorie se includ oligo- şi poliglucidele;
  - heterozidele sunt formate dintr-un glicon (rest de ozăă) şi un aglicon (substanţă neglucidică), ca de exemplu: glicozidele, aminoglucidele, acizii nucleici (heterozide complexe) etc.

Criteriul biologic de clasificare a poliglucidelor este legat direct de rolul pe care acestea îl au în organismele vii:

- poliglucide de rezervă (ca: amidonul, inulina, glicogenul etc.) şi
- poliglucide structurale (ca: celuloza, chitina etc.).

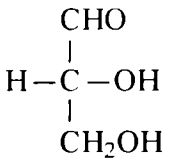
I.2. Monoglucide

În natură, monoglucidele se găsesc fie în stare liberă, fie combinate cu alte substanţe, fiind precursori şi intermediari în diverse reacţii metabolice.

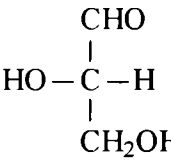
I.2.1. Structură

Cu excepţia dihidroxiacetonei, considerată ca cea mai simplă cetoză, celelalte monoglucide prezintă activitate optică.

Aldehida glicerică, cea mai simplă aldoză, având un singur atom de carbon asimetric va prezenta doi enantiomeri: D(+) sau R(+) glicerinaldehidă si L(-) sau S(-)glicerinaldehidă.



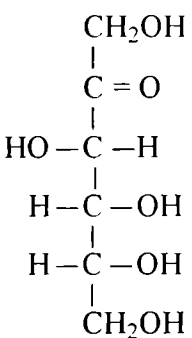
D(+) sau R(+) glicerin-aldehidă



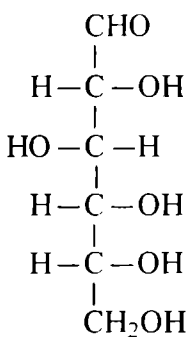
L(-) sau S(-) glicerin-aldehidă

Celelalte monoglucide au mai mulţi atomi de carbon asimetrici. Astfel, pentru n atomi de caron asimatrici (chirali), teoretic trebuie să corespundă 2^n stereoizomeri.

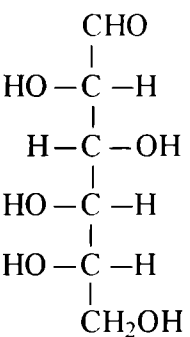
Practic, monoglucidele se împart în două serii (familii), după cum atomul de carbon asimetric cel mai îndepărtat de grupa carbonil (aldehidă sau cetonă) are fie configuraţia D-glicerinaldehidei, fie cea a L- glicerinaldehidei.



D Fructoză



D Glucoză

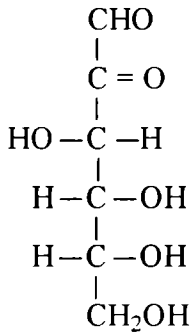


L Glucoză

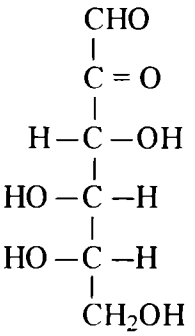
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Astfel, se observă că D şi L glucoza sunt enantiomeri, aflați în raport obiect – imagine oglindită (de nesuperpozabilitate); acelaşi lucru se observă pentru toate monoglucidele, fiecărui termen din familia sterică D corespunzându-i enantiomerul său din familia sterică L.

În cazul glucidelor cu mai mult de un atom de carbon chiral în moleculă, activitatea optică globală este o rezultantă a activităților optice ale fiecărui atom de carbon asimetric în parte. De aceea, semnul activității optice a moleculei poate fi + sau –, ceea ce înseamnă că notațiile D şi L (cu caracter pur convențional) nu au nici o legătură cu aceste semne:



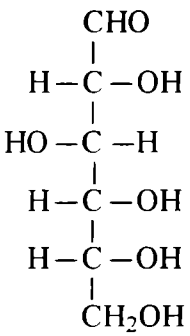
D(-) Fructoză (naturală)



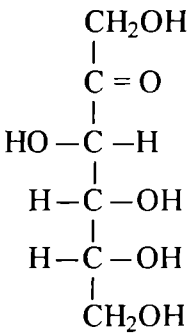
L(+) Fructoză (nenaturală)

I.2.1.1. Oze epimere

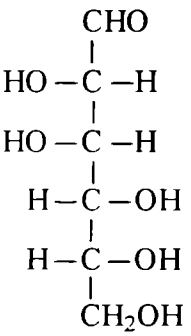
Diastereoizomerii unei molecule, care diferă între ei doar prin configurația unui singur atom de carbon, se numesc epimeri. Acest aspect se întâlneşte şi în cazul monoglucidelor. Astfel: D-glucoza, D-fructoza şi D-manoza sunt epimeri; D-glucoza şi D-galactoza se află în acelaşi raport:



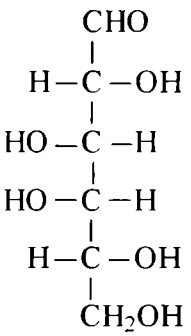
D Glucoza



D Fructoza



D Manoza



D Galactoza

I.2.1.2. Structuri ciclice

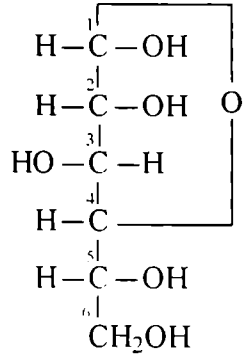
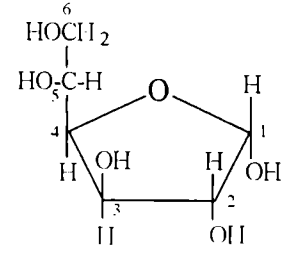
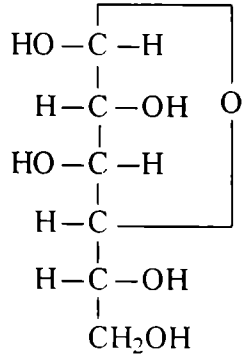
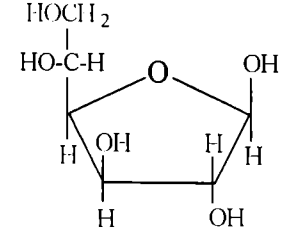
Triozele şi tetrozele au structuri aciclice, în timp ce ozele superioare pot prezenta atât structuri aciclice (mai stabile) cât şi ciclice (întâlnite mai ales în soluții), de tip semiacetalic, ca rezultat al adiției intramoleculare a unei grupe OH (primar sau secundar) la grupa carbonil a aldozei sau cetozei.

Rezultă cicluri semiacetalice de cinci atomi (furanozice) sau de şase atomi (piranozice), care pot fi reprezentate în mai multe moduri (tabel nr. I.1).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

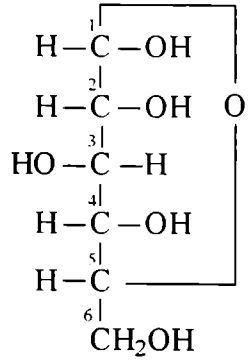
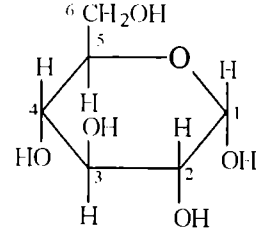
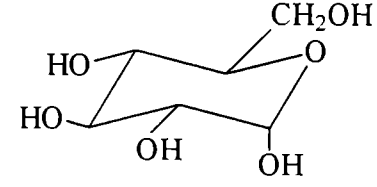
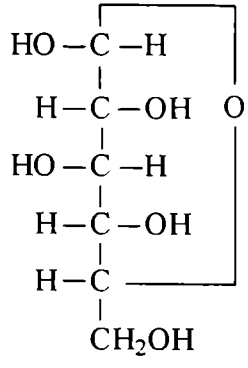
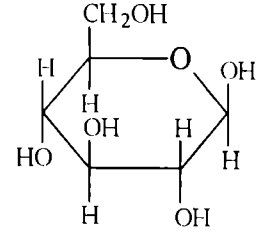
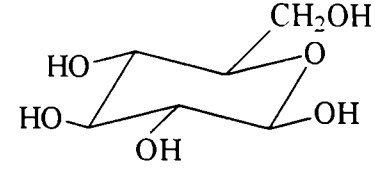
Tabel nr. I.1

Moduri de reprezentare a structurilor semiacetalice ale ozelor

Cicluri	Anomeri	Formule de proiecție plană (Fischer)	Formule perspectivice (Haworth)	Formule conformaționale
Furanozice	α-D-Gluco-furanoză			—
	β-D-Gluco-furanoză			—

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(continuare tabel)

Piranozice	α-D-Gluco-piranoză			
	β-D-Gluco-piranoză			

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Existența ciclurilor semiacetalice conduce la o serie de consecințe, care au fost confirmate de proprietățile fizice și chimice ale ozelor:

a) Apariția unui atom de carbon asimetric suplimentar (rezultat prin semiacetalizare) față de atomii de carbon chirali prezenți în structurile aciclice. Observația a fost verificată prin existența în realitate a unui număr dublu de stereoizomeri ai ozelor respective față de cel calculat teoretic (2^n) pentru structurile aciclice.

b) Grupa hidroxi (denumită și grupă glicozidică) legată de acest atom de carbon chiral suplimentar prezintă o reactivitate deosebită (mult mai mare) decât celelalte grupe alcoolice din moleculă.

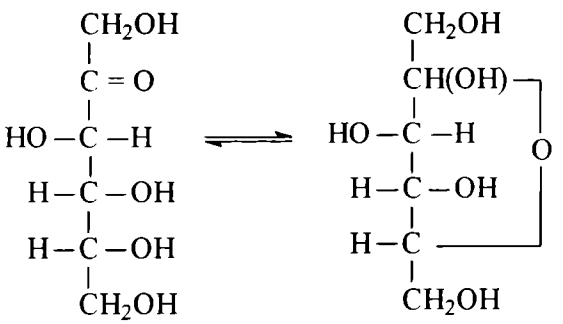
c) Apariția anomerilor α și β (stereoizomeri datorați celor două configurații posibile ale atomului de carbon al grupei OH glicozidice).

d) Datorită stabilității mai mari a ciclurilor de șase atomi, hexozele prezintă în stare liberă structura piranozică și numai în ozide pot adopta structuri furanozice.

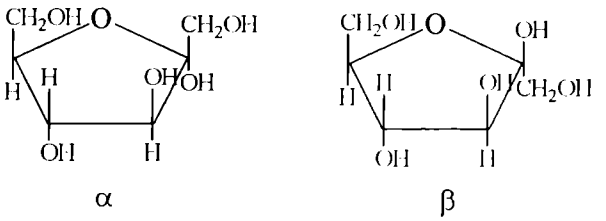
e) Dacă în cazul ciclurilor furanozice, formulele perspectivice (Haworth) se poate aproxima că ar fi destul de apropiate structurii reale a ozelor, în cazul ciclurilor piranozice cea mai corectă reprezentare stereochimică simplificată este formula conformațională.

f) În cazul piranozelor, anomerul β este cel mai stabil (prezent în majoritatea hexozelor și în pentoze în stare liberă), deoarece grupa OH glicozidică ocupă o valență ecuatorială și nu axială, ca în cazul anomerului α.

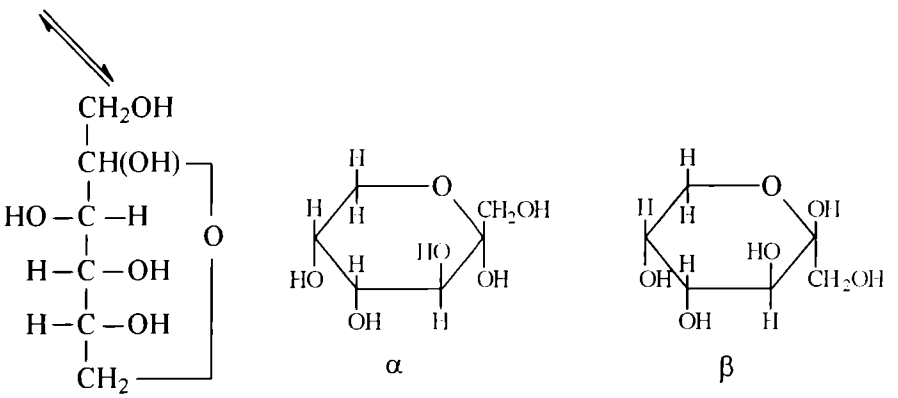
În stare liberă, fructoza prezintă ciclu piranozic și numai în oligo- sau poliglucide se găsește sub formă furanozică:



D Fructoză



D - Fructofuranoză
(în oligo și poliglucide)



D - Fructopiranoză (în stare liberă)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.2.1.3. Mutarotația

Pe lângă alte proprietăți fizice şi chimice (număr de stereoizomeri, reactivitatea grupelor OH etc.), fenomenul mutarotației a reprezentat un argument în plus pentru existența structurilor ciclice ale ozelor.

S-a observat astfel că glucoza obişnuită (cu p.t.=146°C) este de fapt anomerul α, care prezintă în soluție apoasă o rotație specifică $[\alpha]_D = +112^\circ$. Prin şedere, are loc o scădere treptată a valorii rotației specifice până la +52,5°, când se stabilizează, formându-se un amestec de echilibru din anomerii α şi β.

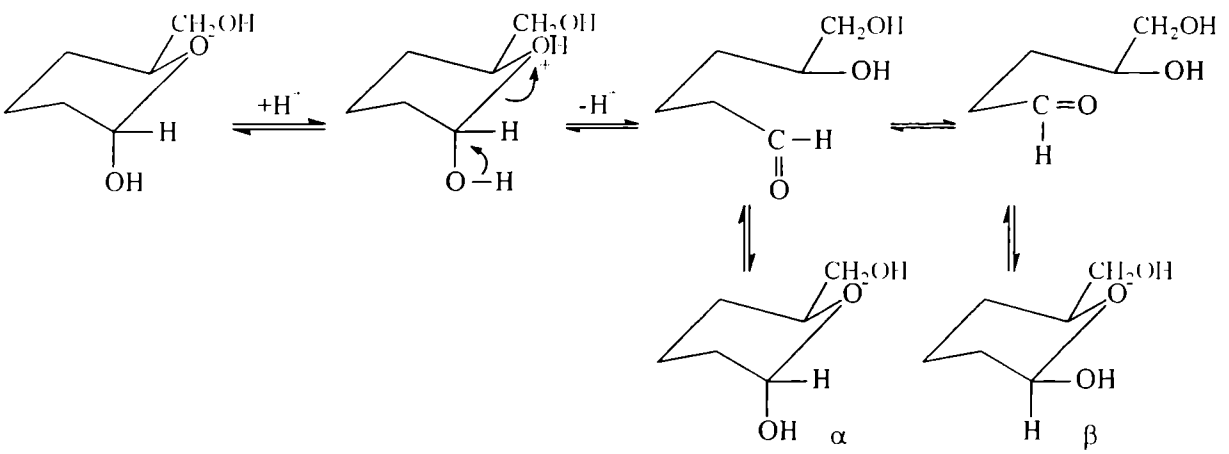
La rândul său, anomerul β (cu p.t.=150°C), obținut prin recristalizarea amestecului de echilibru din acid acetic, prezintă în soluție apoasă prospăt reparată o rotație $[\alpha]_D = +19^\circ$. Prin şedere, se observă o creştere treptată a rotației optice până la valoarea constantă de +52,5°, corespunzătoare amestecului de echilibru al anomerilor α şi β. Acest fenomen a fost denumit mutarotație şi este datorat interconversiei celor doi anomeri în prezența unor urme de acizi sau baze. S-a constatat că, în atmosferă inertă şi în apă deionizată, mutarotația nu se produce.

S-a tras concluzia că echilibrul dintre cei doi anomeri nu se stabileşte direct, ci prin intermediul formei aciclice (tautomerie oxo-ciclică) a cărei apariție este catalizată de acizi şi baze.

În soluție, concentrația formei aciclice este extrem de mică, nefiind decelabilă nici cu reactivul Schiff (caracteristic grupei aldehidice). În amestecul de echilibru predomină anomerul β, mai stabil (în proporție de 64%), față de anomerul α (36%).

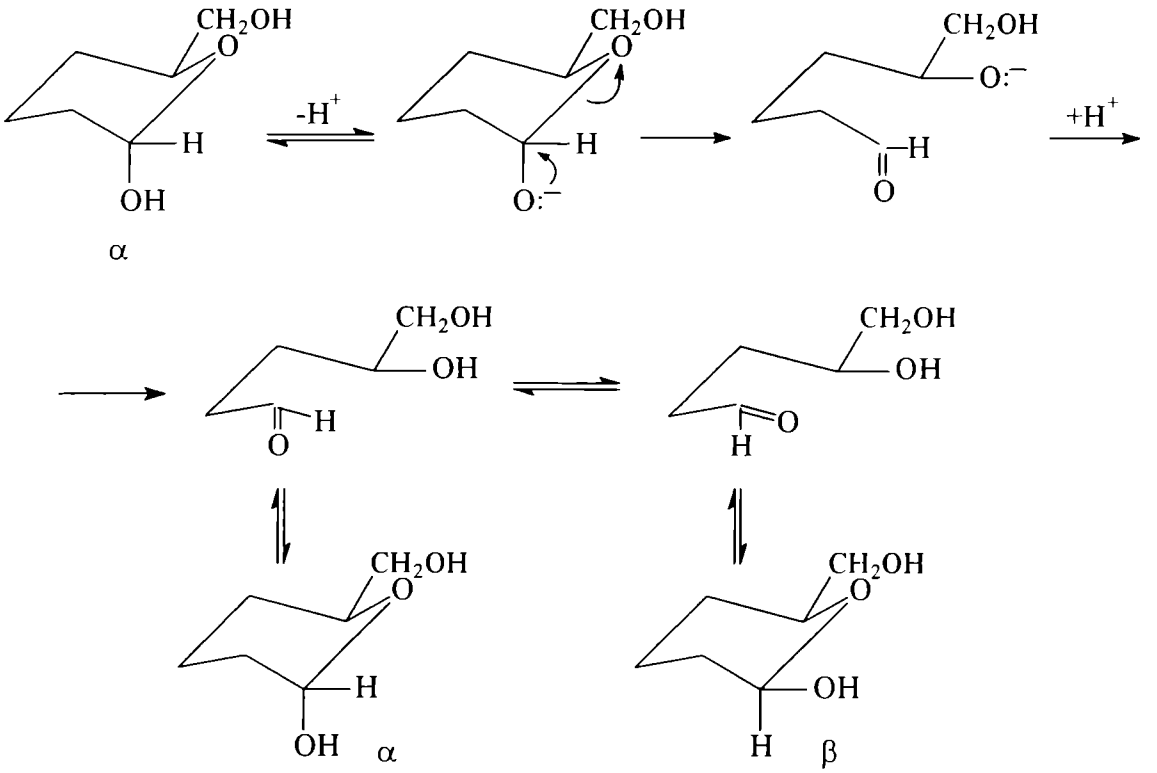
Mecanismul apariției structurii aciclice (fără de care mutarotația n-ar fi posibilă) poate fi schematizat astfel:

- În cataliză acidă:



- În cataliză bazică:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



I.2.2. Reacții chimice ale monoglucidelor

Cele mai răspândite în materia vie sunt hexozele. Astfel, glucoza, considerată "carburant univesal" al celulelor, este prezentă în toate fructele; fructoza este răspândită în multe fructe, dar şi în miere, iar galactoza este un component al "zahărului de lapte" (lactoza).

Monoglucidele sunt substanțe solide, cristaline, solubile în apă şi insolubile în solvenți organici polari şi nepolari.

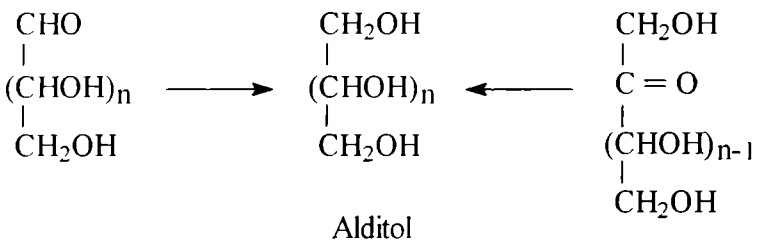
Principalele grupe funcționale ale monoglucidelor sunt grupele carbonil (aldehidă sau cetonă) şi grupele alcoolice secundare şi primare.

De aceea, ele vor prezenta atât proprietăți specifice acestor grupe funcționale, dar şi proprietăți speciale, datorate prezenței lor simultane pe aceeaşi moleculă.

I.2.2.1. Proprietăți datorate prezenței grupelor carbonil

A. Reducerea

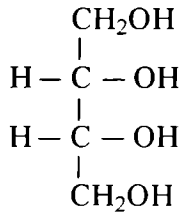
În urma reducerii grupei carbonil din aldoze şi cetoze se obțin polialcooli numiți alditoli.



Alditol

Dintre tetritoli, singurul existent liber în stare naturală (în alge, fungi şi licheni) este mezoeritrita:

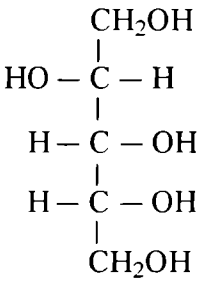
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



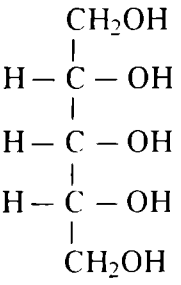
Pentitolii sunt mai răspândiți atât în regnul vegetal cât şi în cel animal.

Astfel, D-arabitolul s-a izolat din unele ciuperci şi din *Adonis kernalis* (ruşcuța primăvaratică).

D-Ribitolul este o componentă majoră a vitaminei B_2 (riboflavina) din plante verzi, ficat, rinichi, ouă, lapte, drojdie de bere.



D-Arabitol



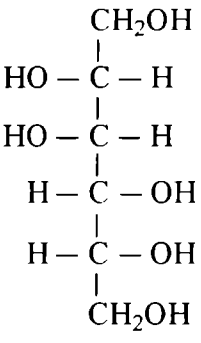
D-Ribitol

În ceea ce-i priveşte, hexitolii sunt prezenti mai ales în regnul vegetal.

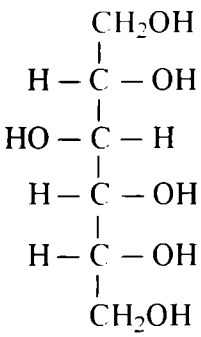
D-Manitolul (manita), izolat din mana arborelui *Traxinus ornus*, se mai găseşte şi în unele specii de alge marine (*Laminaria digitala*).

D-Sorbitolul (sorbita) este prezent în special în fructele din familia rozaceelor. Este un intermediar important în sinteza industrială a vitaminei C, în care se obține prin reducerea catalitică a D glucozei anhidre.

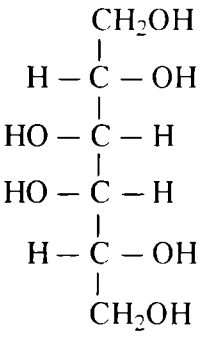
Prin reducerea D-galactozei se obține dulcita, izolată din alge marine şi plante terestre.



D-Manitol



D-Sorbitol
(D-Glucitol)



Dulcita

B. Oxidarea

– Monoglucidele (în special aldozele) sunt reducători slabi, pe această proprietate bazându-se identificarea zaharurilor reducătoare (aldoze dar şi oligo- şi poliglucide, care conțin în moleculă grupe $-C\overset{O}{\underset{H}{\diagdown\!\!\diagup}}$ libere).

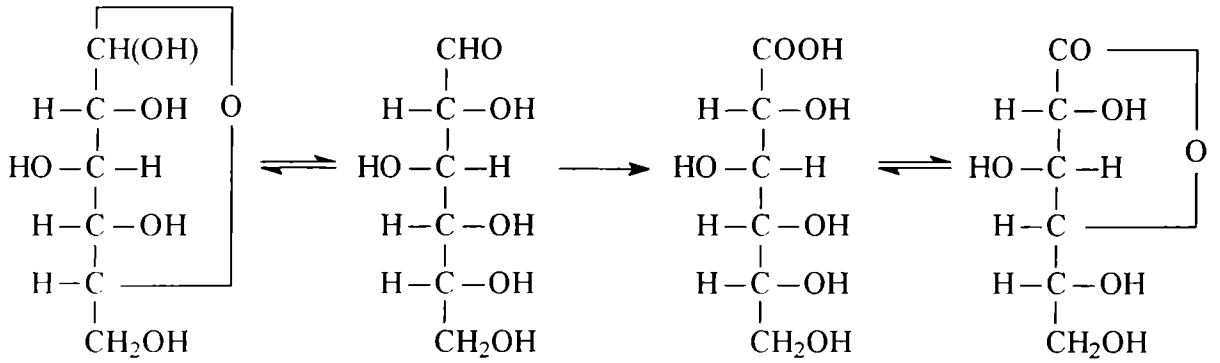
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cel mai frecvent este utilizat reactivul Fehling (care conține ioni Cu^{2+} și este format din: $CuSO_4$, NaOH și tartrat dublu de sodiu și potasiu). Prin încălzire cu un glucid reducător, are loc precipitarea oxidului cupros, de culoare roșie:

$$Cu^{2+} \longrightarrow Cu^{+}$$

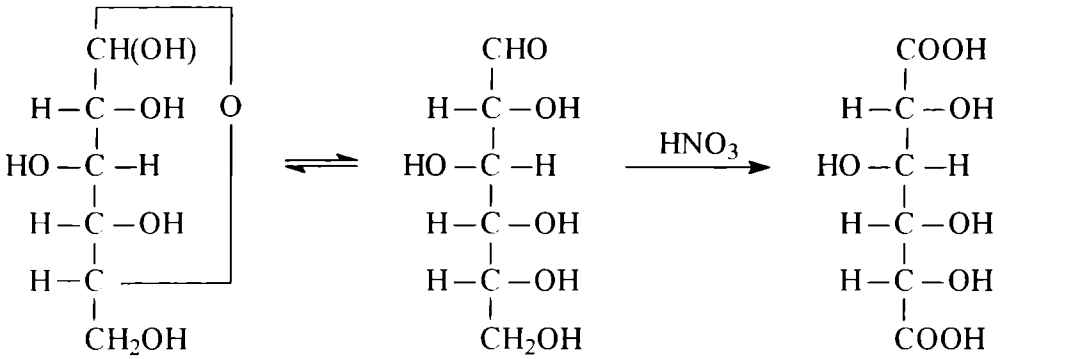
De asemenea, încălzit cu un glucid reducător, reactivul Tollens – o soluție amoniacală de nitrat de argint care contine ioni $[Ag(NH_3)_2]^{+}$ – este redus, cu depunerea unei oglinzi de argint.

– Oxidarea aldozelor cu apă de brom sau de clor conduce la acizi onici (aldonici), care în condițiile de reacție, formează γ-lactone:

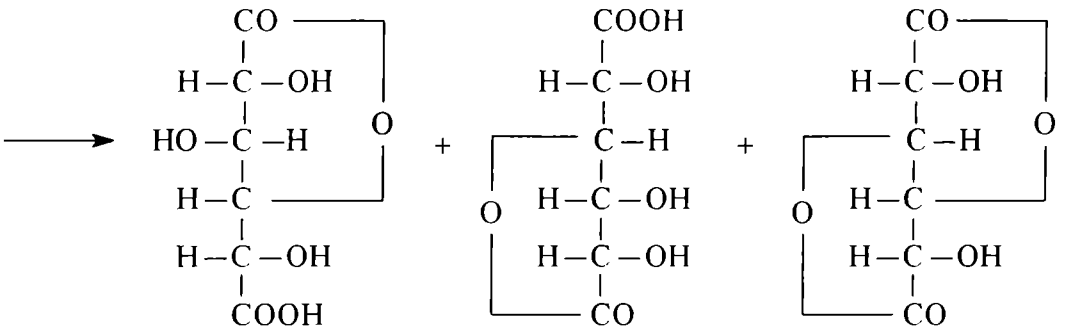


D-Glucoză — Acid D-gluconic — D-Glucono- γ-lactonă

– Utilizând un oxidant mai energic (acid azotic diluat), se obțin acizi zaharici, care se deshidratează cu formarea a trei lactone:



D-Glucoză — Acid D-glucozaharic (glucaric)

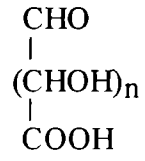


1,4-Lactonă — 3,6-Lactonă — 1,4,3,6-Dilactonă

Lactonele obținute de la acizii onici ca și de la cei zaharici se reduc cu amalgam de sodiu la pH = 3-3,5 cu refacerea grupei CHO a aldozei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

– Altă categorie de acizi derivați de la aldoze este cea a acizilor uronici, în care grupa alcool primar a ozelor (CH_2OH) este oxidată la grupa COOH:

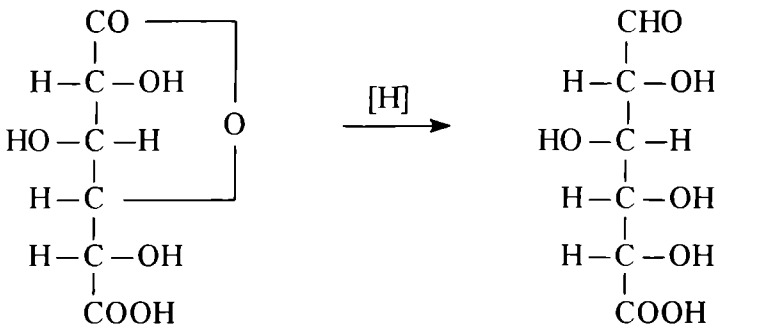


Acid uronic

Asemenea compuși nu se pot obține însă printr-o reactie de oxidare directă a monoglucidelor, care ar putea afecta și grupa CHO (mai reactivă), dar și grupa OH glicozidică.

De aceea, se supun oxidării glucidele eterificate la hidroxilul glicozidic (glicozidele).

Altă cale indirectă de obținere a acizilor uronici constă în reducerea 1,4 lactonelor acizilor zaharici, cu amalgam de sodiu la pH = 3-3,5.



1,4-Lactona acidului D-glucozaharic

Acid D-glucuronic

Acizii uronici sunt produși de bacterii și au actiune antigenică.

Glicozide ale acidului glucuronic cu fenoli și cresoli se găsesc în urină, ca produși de detoxifiere a organismului și de eliminare a resturilor aromatice rezultate din degradarea proteinelor sau a unor medicamente.

Acidul galacturonic este component al acidului pectic și pectinei din pereții celulelor plantelor, prezent în fructe și țesuturi tinere.

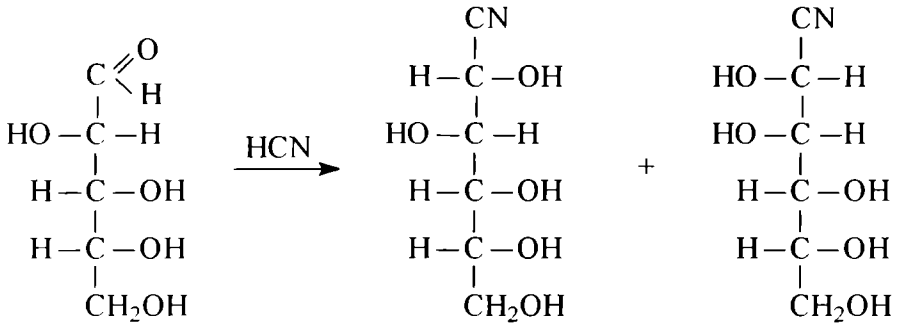
C. Reacții de adiție și de condensare

Grupele carbonilice din monoglucide prezintă toate reacțiile caracteristice acestei funcțiuni.

– Astfel, monoglucidele pot da reacții de adiție nucleofilă (cu acid clorhidric, acid cianhidric, nitrometan etc.). Aceste reacții sunt folosite pentru identificarea zaharurilor, pentru determinarea structurii lor ca și în reacțiile de interconversie.

Asemenea reacții de adiție conduc de obicei la apariția unui nou atom de carbon asimetric; produsul de reacție nu este unitar, ci reprezintă un amestec de epimeri:

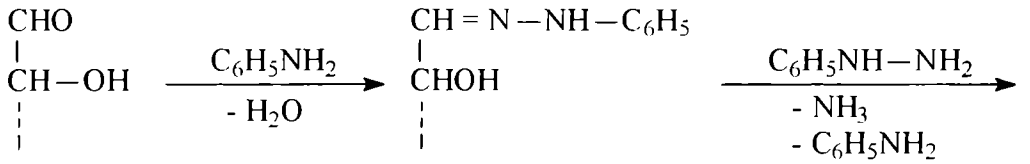
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



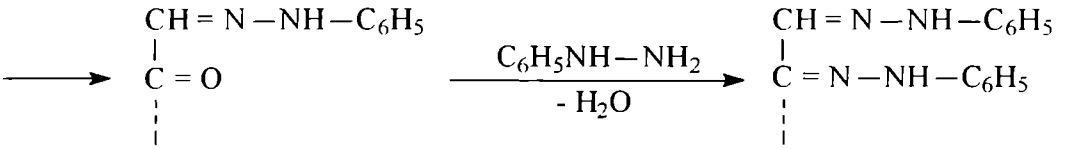
D-Arabinoză D-Glucononitril D-Manononitril

– O reacție deosebită, care se utilizează în mod frecvent la caracterizarea şi dozarea monoglucidelor, este reacția cu fenilhidrazina.

Atât aldozele cât şi cetozele reacționează la rece formând fenilhidrazone. La încălzire, în prezența unui exces de fenilhidrazină se obtin osazone:

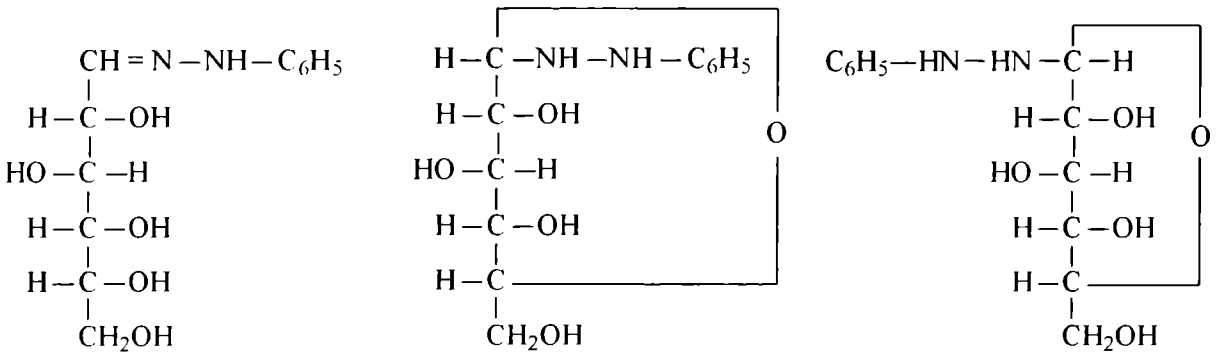


Aldoză Fenilhidrazonă



Osazonă

În soluție, fenilhidrazonele au atât structură aciclică cât şi ciclică:

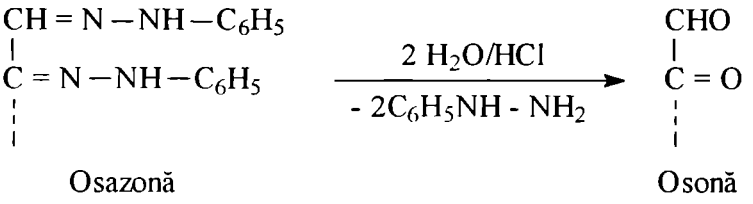


Aciclică Anomer α Anomer β

Fenilhidrazona D-glucozei

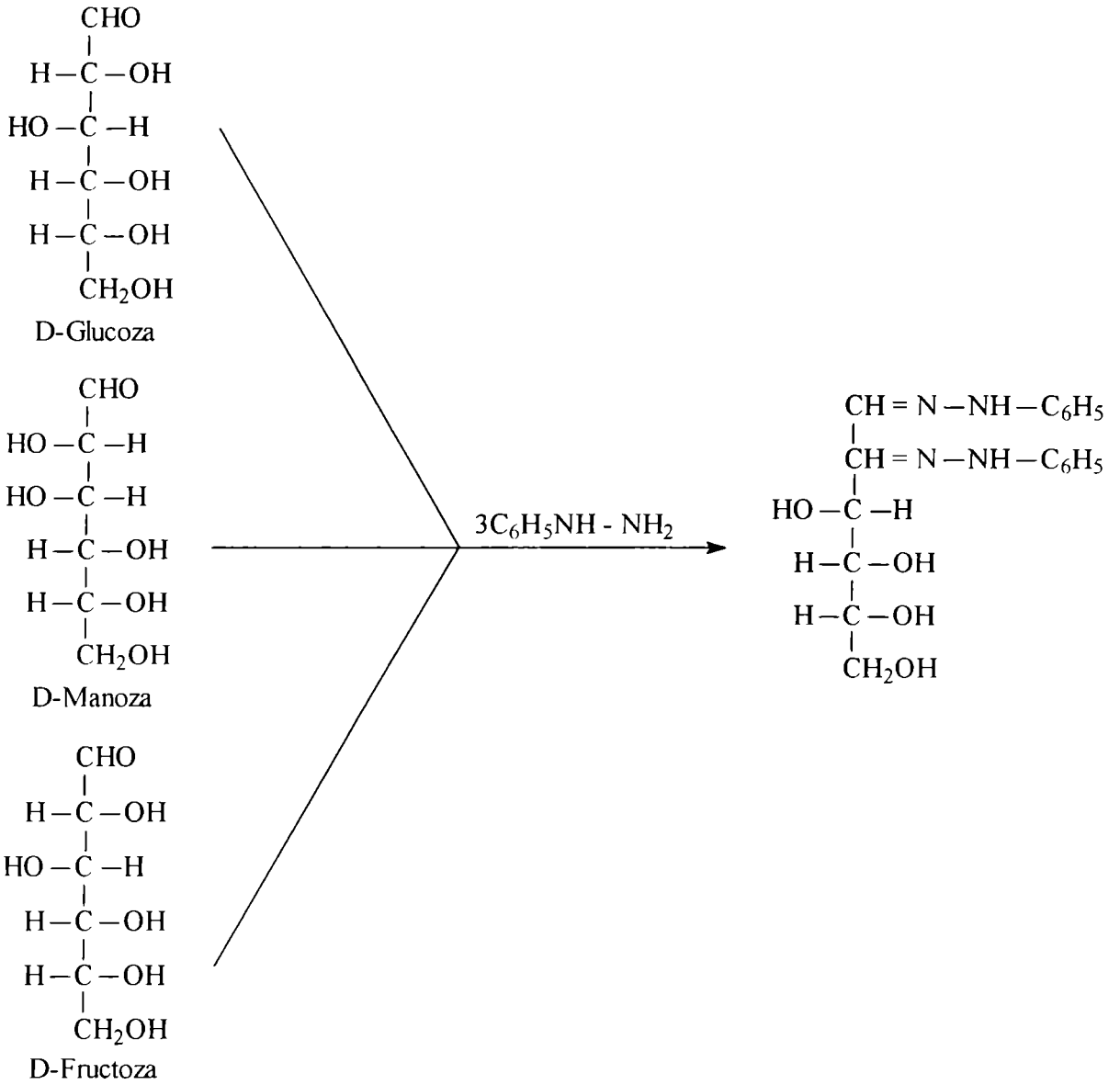
Osazonele sunt substante cristaline, de culoare galbenă, greu solubile, cu puncte de topire caracteristice, care se pot hidroliza la compuşi 1,2 – dicarbonilici, denumiți osone:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



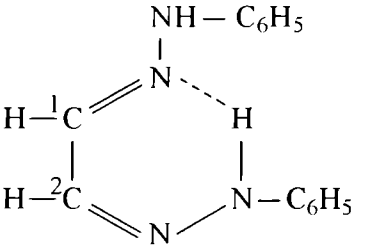
Osazonă Osonă

Întrucât reacția cu fenilhidrazină afectează doar primii doi atomi de carbon din catena monoglucidului, ozele epimere care se deosebesc doar prin configurația acestor atomi, vor da aceeași osazonă:

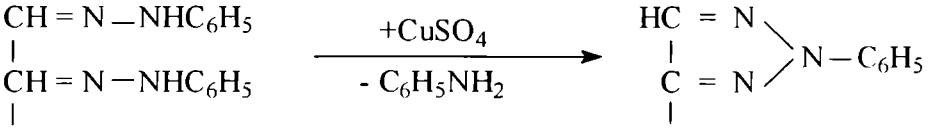


Faptul că reacția cu fenilhidrazină nu avansează de-a lungul catenei, afectând doar primii doi atomi de carbon ai ozei, se datorează stabilității deosebite a osazonei, determinată de existența unei structuri chelatizate:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Prin încălzire cu o soluție de sulfat de cupru, osazonele formează osotriazoli:

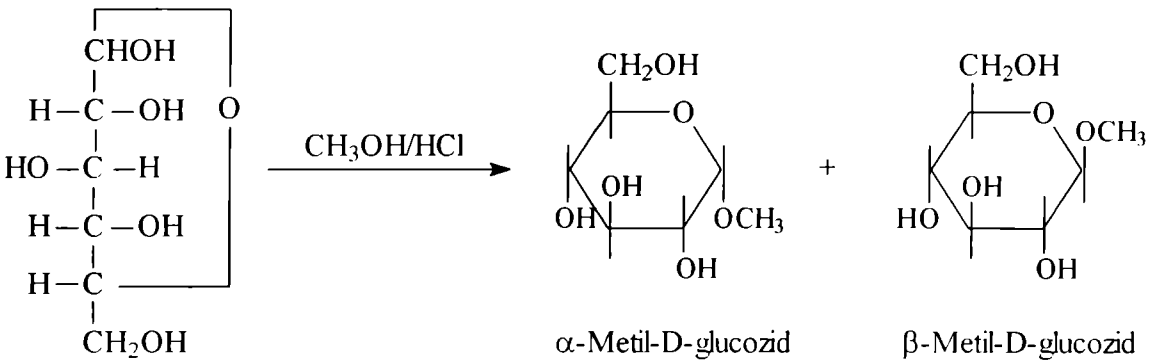


Osazonă — N-Fenilosotriazol

I.2.2.2. Proprietăți datorate prezenței grupelor hidroxil

A. Reacții de eterificare

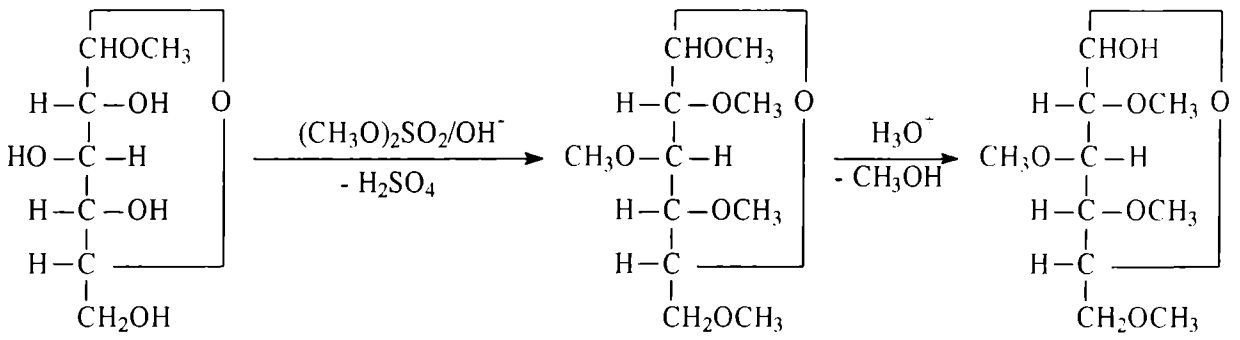
Dintre toate grupele hidroxil prezente în molecula unei monoglucide, cel mai reacționabil este hidroxilul glicozidic, cu caracter semiacetalic. De aceea, la tratare cu alcooli în cataliză acidă, se formează monoeteri cu caracter de acetali, denumiți glicozide sau glicozizi:



α-Metil-D-glucozid — β-Metil-D-glucozid

Glicozidele, având hidroxilul glicozidic blocat prin eterificare, nu dau reacțiile specifice funcției carbonil (oxime, cianhidrine, osazone, reacții de reducere etc.) și nu prezintă mutarotație.

Pentru eterificarea celorlalte grupe hidroxil din moleculele monoglucidelor, sunt necesari agenți de metilare mai reactivi (dimetilsulfat în mediu alcalin sau iodură de metil în prezență de oxid de argint):



1,2,3,4,6-Pentametil-D-glucoză — 2,3,4,6-Tetrametil-D-glucoză

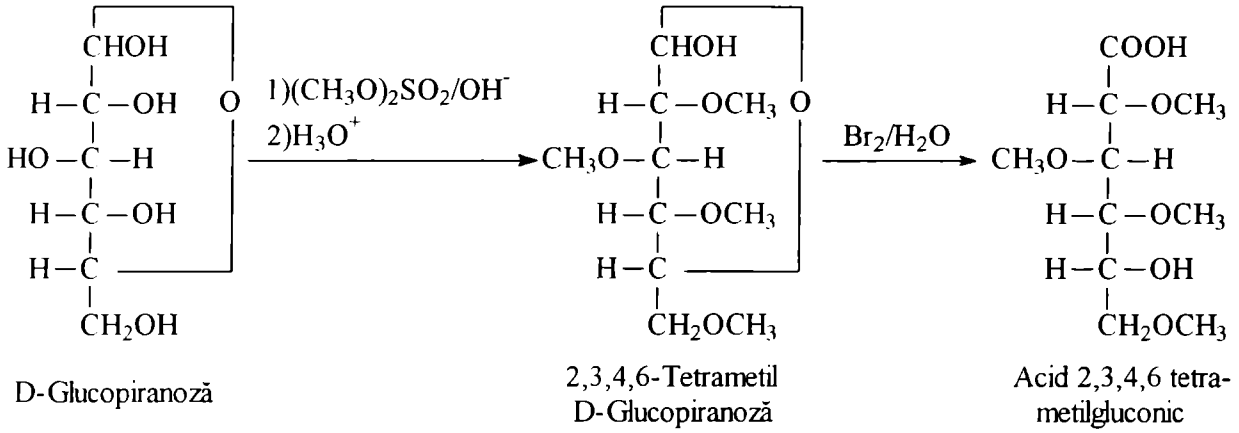
BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ "CAROL I" BUCUREȘTI

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

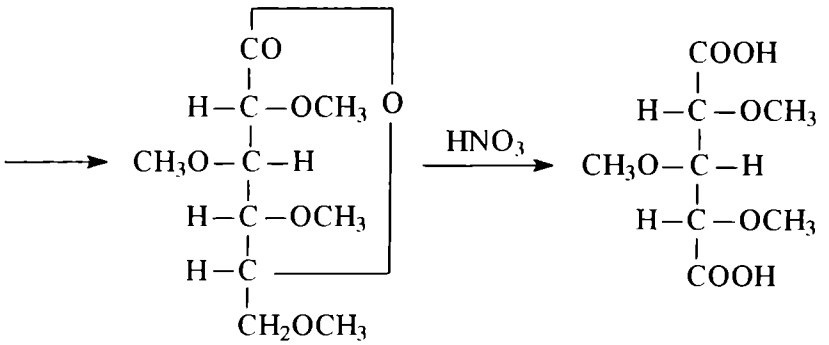
Reactivitatea deosebită a grupei glicozidice a pentametilglucozei poate fi demonstrată şi prin aceea că, în hidroliză acidă, numai această grupă reacţionează, formându-se 2,3,4,6-tetrametil-D-glucoză.

Eterii metilici ai monoglucidelor au fost folosiţi pentru determinarea naturii (piranozică sau furanozică) a ciclurilor acestora.

Astfel, metoda Haworth constă în oxidarea 2,3,4,6-tetrametil-D-glucozei la acid 2,3,4,6-tetrametil-D-gluconic, care se transformă în δ-lactona corespunzătoare:



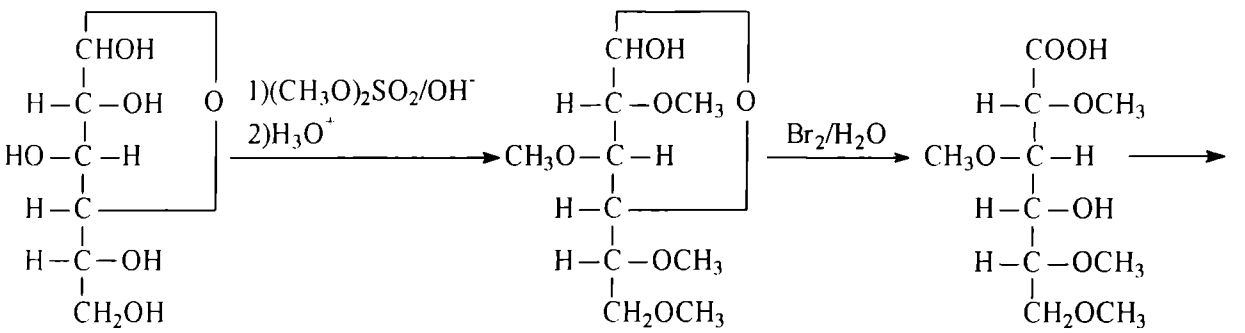
D-Glucopiranoză — 2,3,4,6-Tetrametil D-Glucopiranoză — Acid 2,3,4,6 tetrametilgluconic



δ-Lactonă — Acid trimetoxiglutaric (mezo)

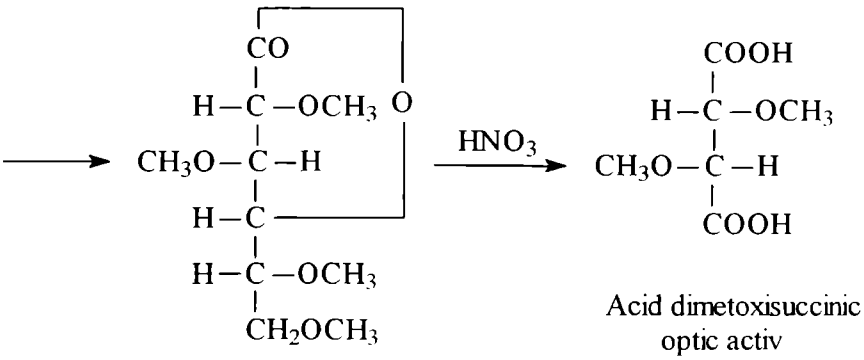
În continuare, prin oxidarea δ-lactonei cu acid azotic, se obţine acid trimetoxiglutaric (stereoizomerul mezo). Acest lucru dovedeşte că D-glucoza a avut un ciclu piranozic.

Aplicând aceeaşi serie de transformări pentru a D-glucoză cu ciclu furanozic, rezultatul final va fi obţinerea acidului dimetoxisuccinic optic activ:



D-Glucofuranoză — 2,3,5,6-Tetrametil D-Glucofuranoză — Acid 2,3,5,6 tetrametil-D-gluconic

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



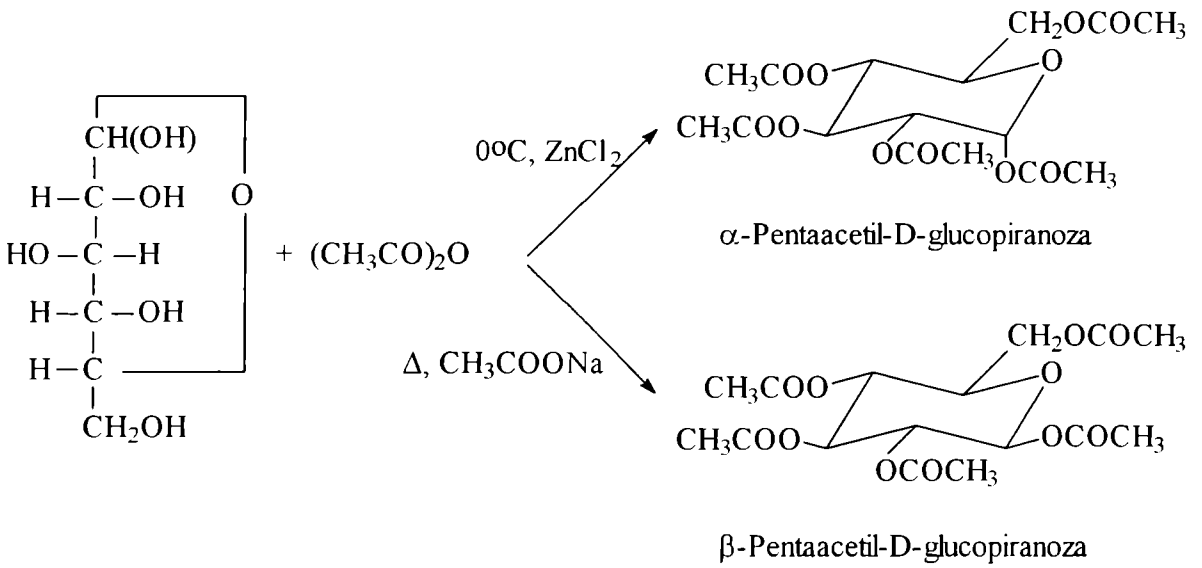
γ-Lactonă

Acid dimetoxisuccinic optic activ

B. Reacții de esterificare

Esterificarea totală a monoglucidelor are loc la tratarea cu anhidridă acetică.

Anomerii α şi β ai D-glucopiranozei conduc la produşi de reacție diferiți, dintre care β-pentaacetil-D-glucopiranoza este cel mai stabil, deoarece hidroxilul glicozidic esterificat ocupă o valență ecuatorială. De aceea, lucrând la rece (0°C) cu catalizator $ZnCl_2$ anhidru, se obține anomerul α (reacție controlată cinetic), în timp ce în prezența de acetat de sodiu sau de piridină anhidră se formează anomerul β (reacție controlată termodinamic):



α-Pentaacetil-D-glucopiranoza

β-Pentaacetil-D-glucopiranoza

I.2.2.3. Reacții de interconversie

În această categorie se includ:

A. – reacții de scurtare a catenei (transformarea unei oze superioare într-o oză inferioară);

B. – reacții constructive (transformare a ozelor inferioare în oze superioare prin lungirea catenei);

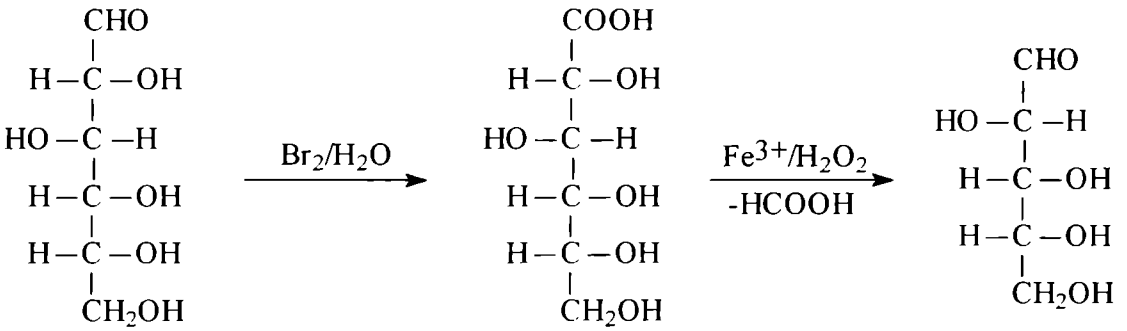
C. – epimerizări.

Alături de celelalte reacții specifice glucidelor, aceste transformări sunt utilizate frecvent pentru determinarea structurii acestora.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A. Reacții de scurtare a catenei

Degradarea Ruff constă în oxidarea sării de calciu a unui acid aldonic, utilizând acetat feric și apă oxigenată:

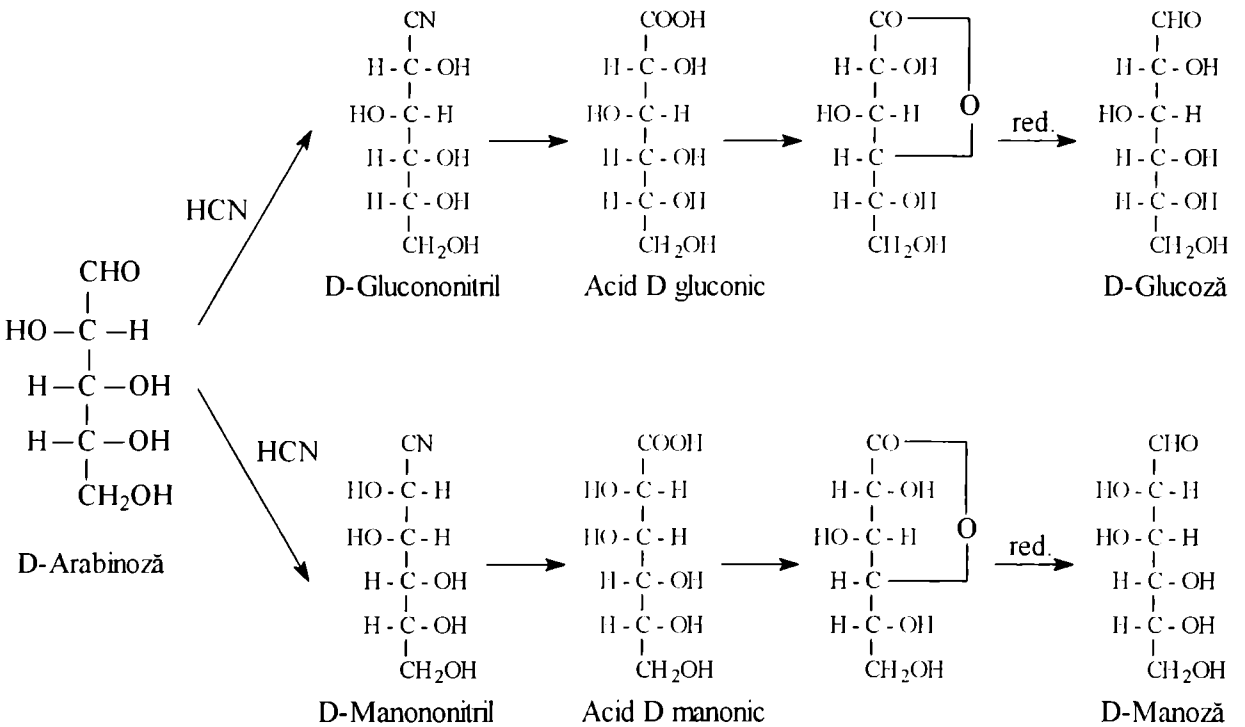


D Glucoza — Acid D-gluconic — D-Arabinoză

Metodele de scurtare a catenei se pot aplica și la diglucidele reducătoare, pentru determinarea structurii acestora.

B. Reacții constructive (de lungire a catenei)

Cea mai importantă metodă de lungire a catenei unei aldoze este metoda Kiliani-E. Fischer, care constă în adiția HCN la grupa aldehidică a aldozei, cu formarea unui amestec de două cianhidrine epimere. Hidroliza acestora conduce la acizii onici respectivi, care se lactonizează. Lactonele se reduc ulterior cu amalgam de sodiu la pH = 3 – 3,5, obținându-se două oze epimere superioare:



D-Gluconononitril — Acid D gluconic — D-Glucoză

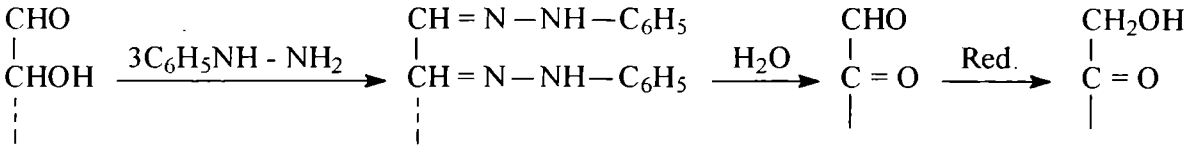
D-Arabinoză

D-Manononitril — Acid D manonic — D-Manoză

C. Reacții de epimerizare (interconversia ozelor epimere)

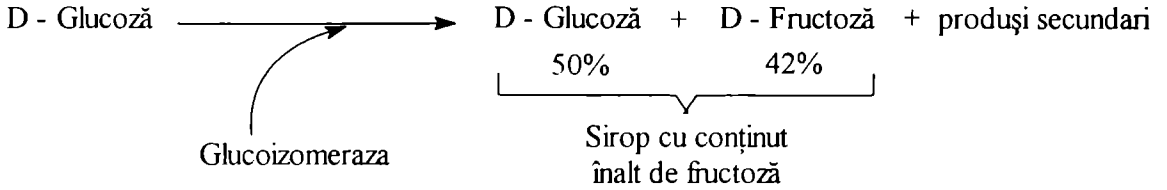
- O metodă de transformare a unei aldoze în cetoza sa epimerică se bazează pe reacția de formare a osazonelor, hidroliza acestora și reducerea selectivă a osonei obținute, cu amalgam de sodiu în mediu acid:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



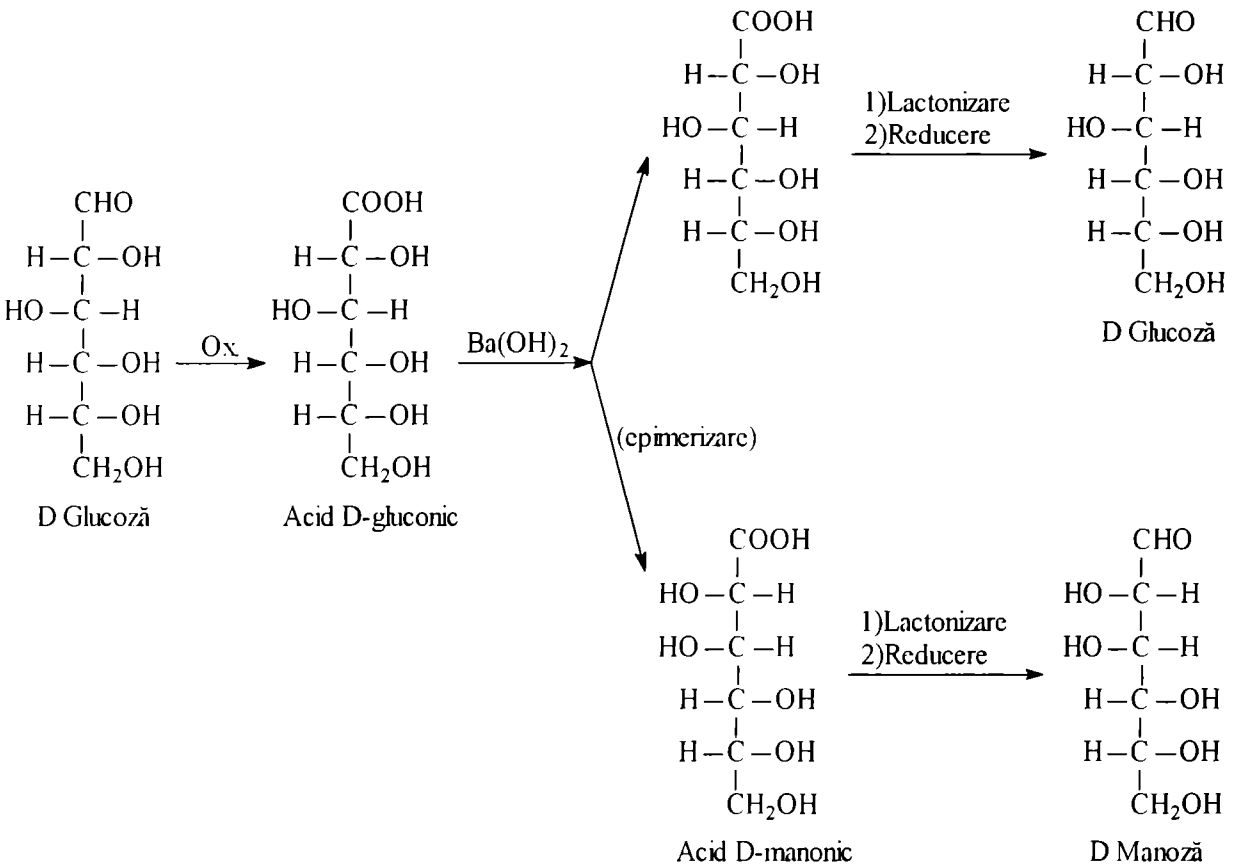
Epimerizarea enzimatică a D-glucozei în D-fructoză este utilizată industrial pentru obținerea siropului cu continut înalt de fructoză, care poate înlocui zaharoza din produsele alimentare.

Se utilizează ca substrat siropul de glucoză, obtinut din amidonul de porumb sau cartofi, cu o capacitate edulcorantă estimată la 70 – 75% din cea a zaharozei. Drept biocatalizator in această conversie se utilizează glucoizomeraza pură sau celule microbiene care conțin glucoizomerază (*Bacillus coagulans, Actinoplanes missouriensis, Streptomyces rubiginosus* etc.):



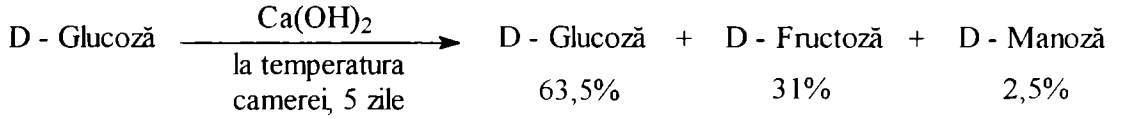
Siropul cu conținut înalt de fructoză obținut în acest fel, are o capacitate edulcorantă egală cu cea a zaharozei.

- O metodă de conversie a unei aldoze în aldoza sa epimeră este ilustrată în cazul glucozei, care este oxidată întâi la acid D-gluconic (cu apă de clor sau de brom). Acidul gluconic, în prezența apei de barită, suferă o racemizare parțială la C2, rezultatul fiind izomerizarea parțială la acid D-manonic:

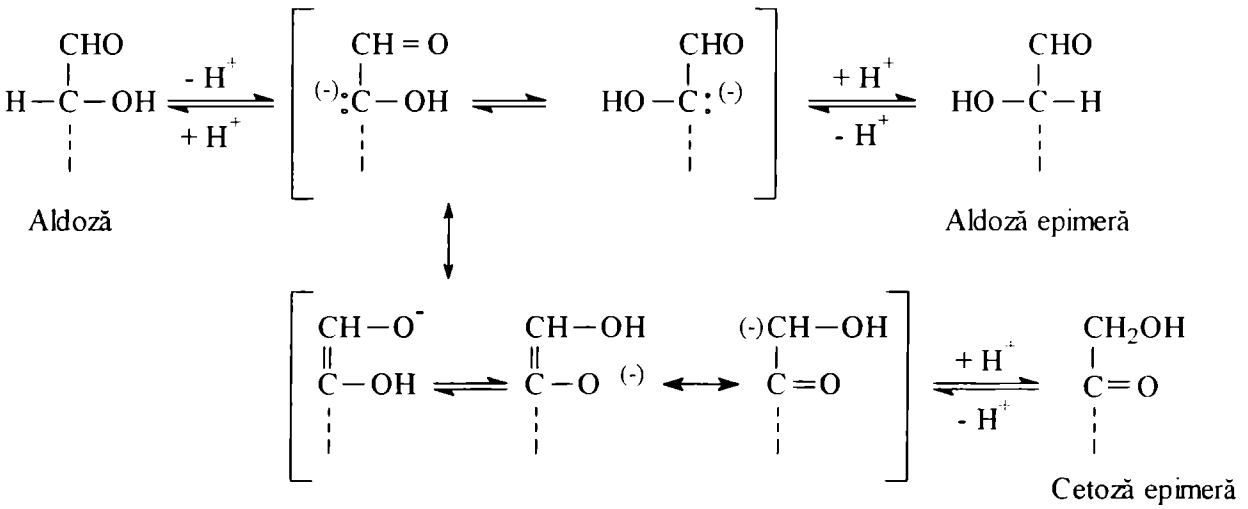


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- Transpoziția de Bruyn – van Eckstein constă în tratarea monoglucidelor cu baze slabe; în urma epimerizării se stabilește o concentrație de echilibru:



Din ultimele două exemple se poate trage concluzia că epimerizarea este catalizată de baze slabe, mecanismul general fiind următorul:



I.2.2.4. Alte reacții caracteristice monoglucidelor

A. Acțiunea bazelor tari

Hidroxizii alcalini acționează asupra ozelor la cald, provocând o descompunere, cu formarea unui număr mare de produși de degradare.

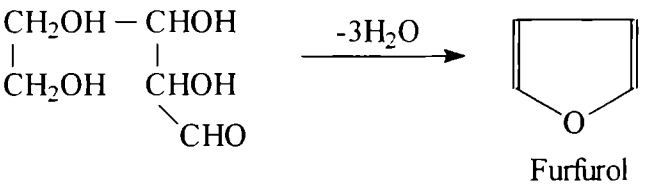
Această comportare este utilizată frecvent ca reacție de identificare a ozelor. Astfel, soluțiile lor apoase tratate la cald cu hidroxizi alcalini de colorează la început în galben, apoi în brun (datorită depunerii unor rășini).

B. Acțiunea acizilor

Monoglucidele sunt în general rezistente la acțiunea acizilor diluați.

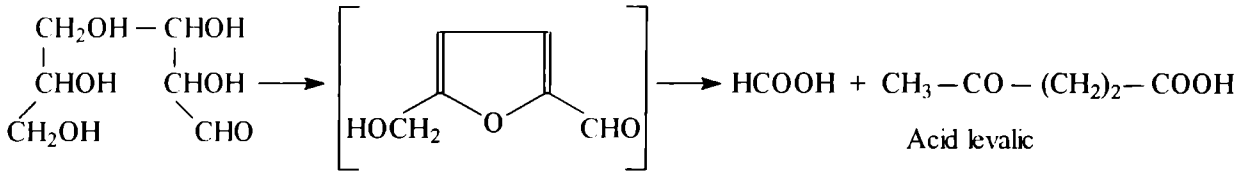
Încălzite însă cu acizi concentrați, au loc descompuneri cu formarea unor produși unitari de degradare. Reacția este utilizată la deosebirea pentozelor de hexoze.

Astfel, pentozele conduc la furfurol:



În aceleași condiții, hexozele dau acid formic și acid levalic (γ-cetoglutaric):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



5-Hidroximetilen furfurol

I.2.3. Compuşi înrudiţi cu ozele

I.2.3.1. Vitamina C

Vitaminele sunt efectori biochimici care îndeplinesc rol de coenzime în unele reacţii metabolice. Aceste substanţe organice indispensabile organismului animal (dar pe care acesta nu le poate sintetiza) se găsesc în cantităţi foarte mici în alimente. Deficienţa sau absenţa vitaminelor determină avitaminozele (stări patologice specifice).

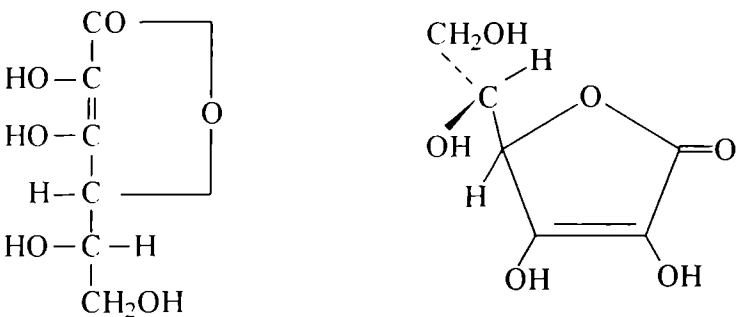
Criteriul de clasificare a vitaminelor este cel al solubilităţii, ele putând fi:

- hidrosolubile (miscibile cu apa, nemiscibile cu solvenţii organici): vitaminele din grupul B, vitamina C;
- liposolubile (miscibile cu solvenţii organici şi relativ nemiscibile cu apa): A, D, E şi K.

Dintre acestea, vitaminele C (acidul ascorbic) şi B_2 (riboflavina) sunt înrudite cu monoglucidele.

Vitamina C, o lactonă aparţinând familiei sterice L, este prezentă în fructe şi legume.

Majoritatea animalelor sintetizează acidul ascorbic, cu excepţia oamenilor, maimuţelor şi cobailor, cărora le lipseşte o enzimă (L-gulonolacton oxidaza) corespunzătoare ultimei etape de biosinteză a vitaminei C.



Acidul L-ascorbic

Vitamina C a fost izolată iniţial din scoarţa capsulelor suprarenale (Szent-Györgyi, 1927). Sursa principală de vitamina C o reprezintă fructele şi legumele, în cantităţi mari fiind prezentă în citrice, spanac, tomate, măceş, ardei etc.

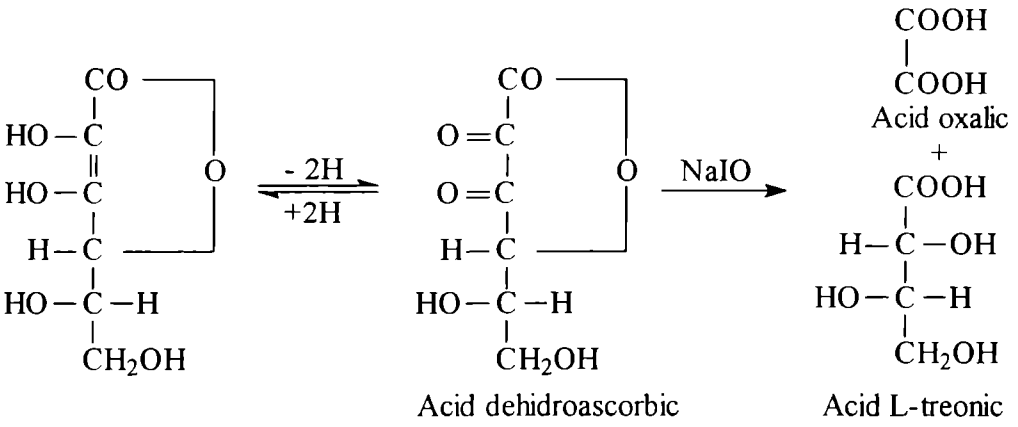
Lipsa îndelungată de acid ascorbic duce la apariţia scorbutului, care se manifestă prin leziuni ale ţesuturilor osos şi conjunctiv, hemoragii, inflamarea gingiilor şi căderea dinţilor.

Principalul rol al vitaminei C este cel de structurare a colagenului, fiind cofactor (împreună cu ionul Fe^{3+}) în reacţia de oxidare a resturilor de prolină din colagen la hidroxiprolină.

Având structură dienolică, acidul ascorbic prezintă tăria acizilor carboxilici. Una dintre grupele enolice are caracter acid (pKa=4,04) şi ionizează, formând ionul ascorbat. Cealaltă grupă

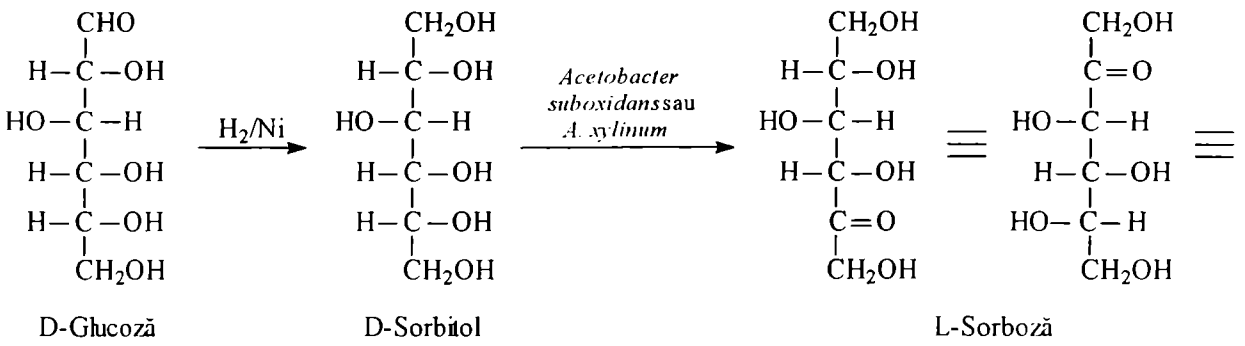
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

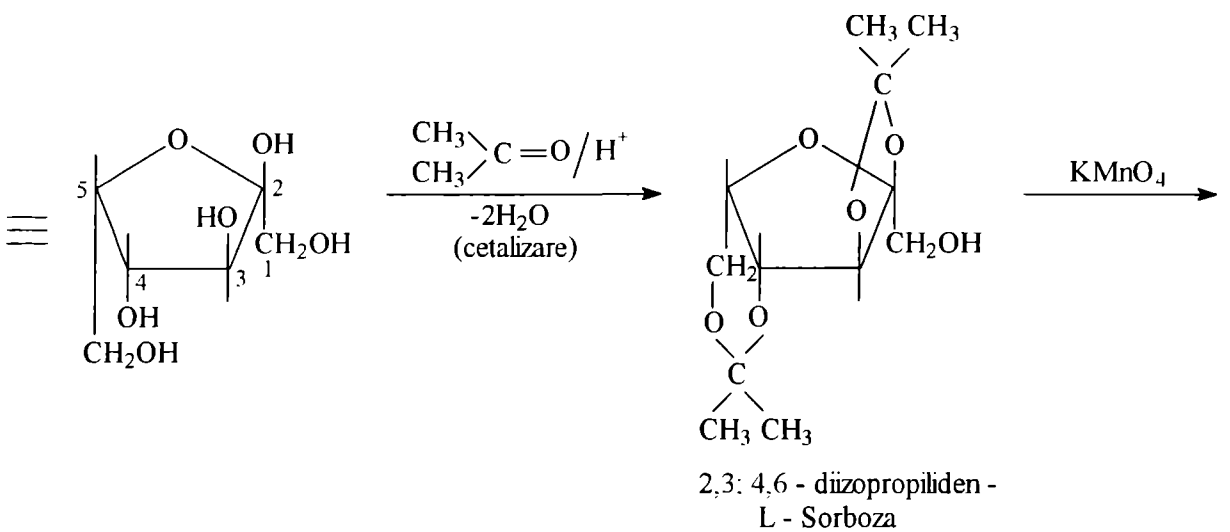
hidroxi acționează ca o grupă reducătoare și este oxidată la dehidroascorbat. Reacția este reversibilă, acest lucru explicând caracterul de agent reducător puternic:



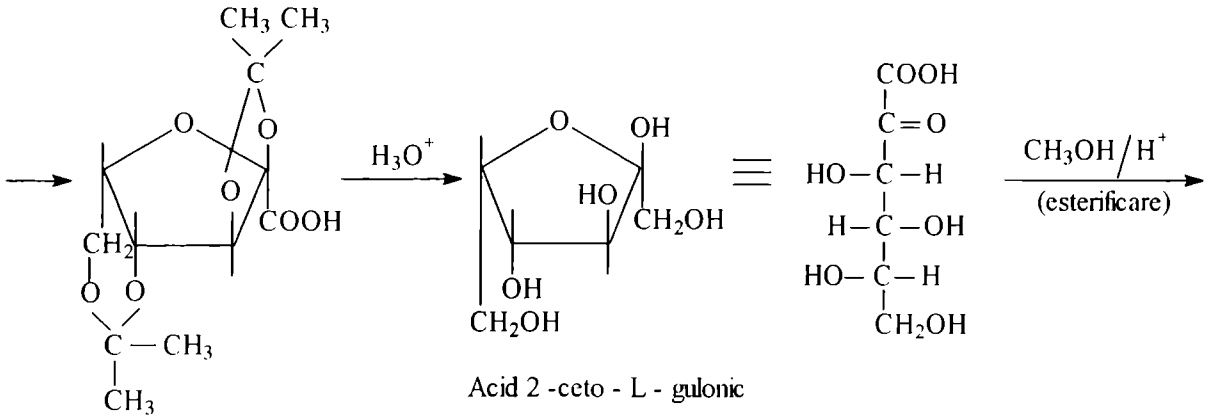
Apartenența acidului ascorbic la seria sterică L a fost demonstrată prin oxidarea degradativă cu hipoiodit de sodiu, când se obține acidul L-treonic.

Industrial, vitamina C se sintetizează pornind de la D-glucoză anhidră, prin următoarea suită de reacții:

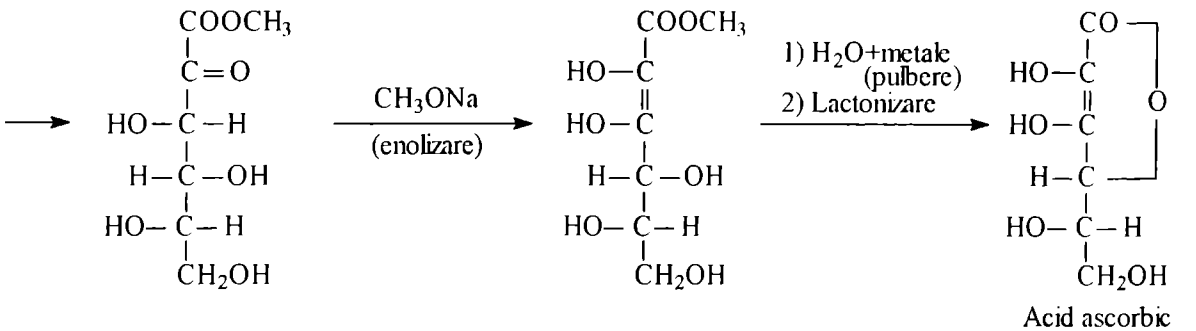




https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Acid 2 -ceto - L - gulonic



Acid ascorbic

I.2.3.2. Vitamina B_2 (riboflavina)

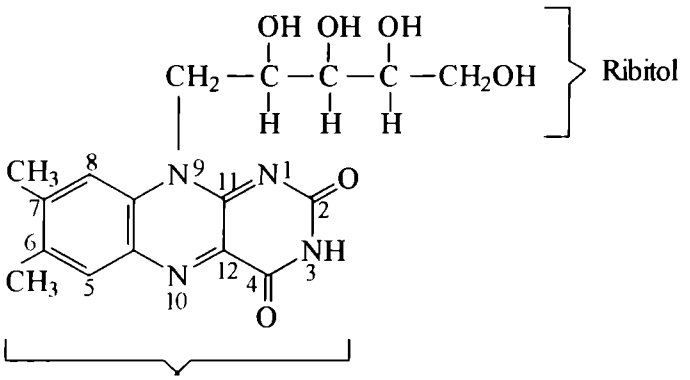
Grupul vitaminelor hidrosolubile B conține un număr de nouă compuşi organici, cu structuri chimice total diferite:

- vitamina B_1 (tiamina);
- vitamina B_2 (riboflavina);
- vitamina B_6 (piridoxina);
- vitamina B_{12} (cobalamina);
- inozitol;
- acid pantotenic (cu forma activă – coenzima A);
- acid folic (acid pteroilglutamic);
- biotina (denumită şi vitamina H);
- nicotinamida (sau niacinamida, care împreună cu acidul nicotinic sau niacina formează vitamina PP).

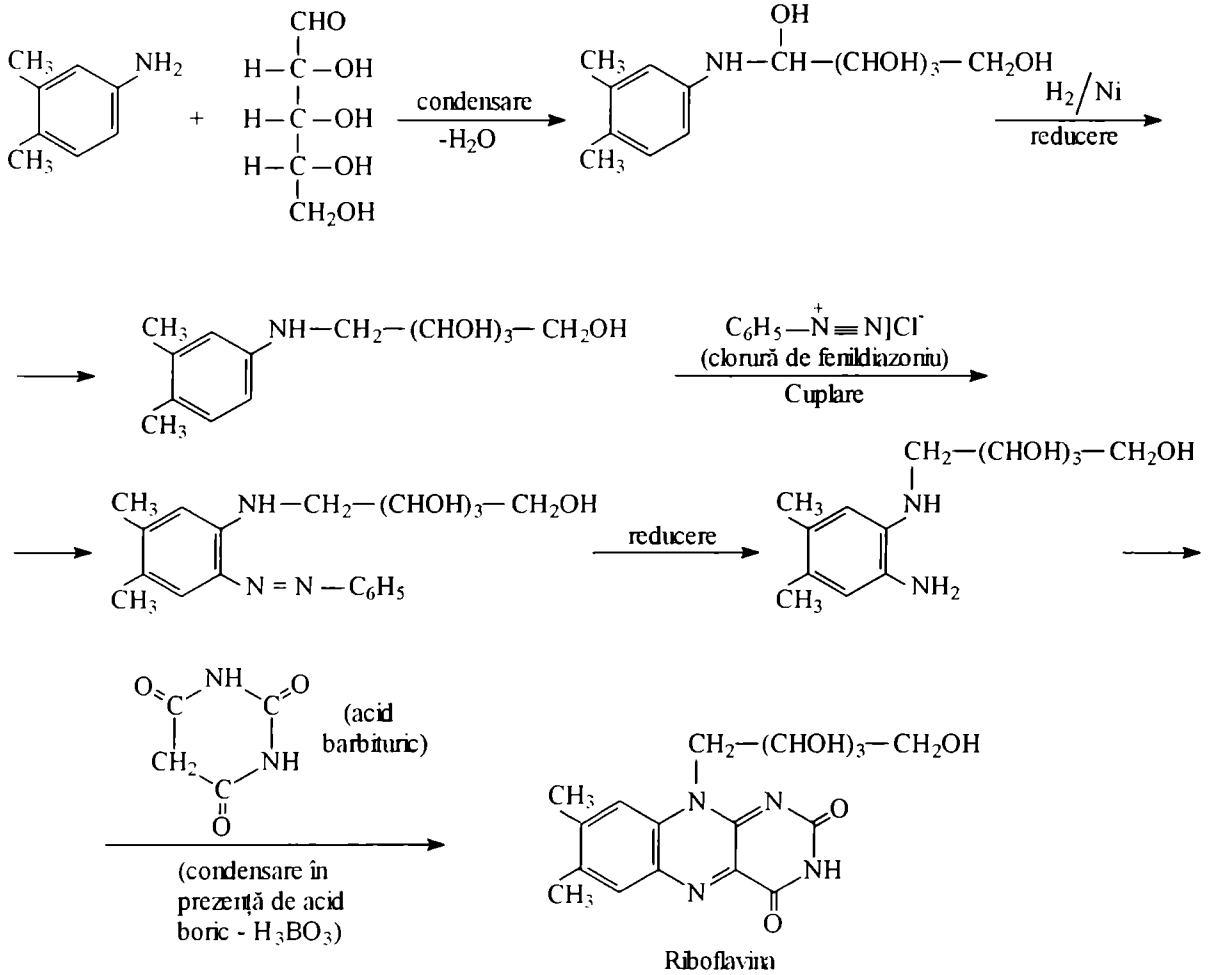
Dintre acestea, înrudită cu glucidele este vitamina B_2 sau riboflavina, prezentă în frunzele verzi, carne, lapte (ca sursă principală). Carența în riboflavină produce afecțiuni ale pielii, mucoasei bucale şi limbii şi perturbări în compoziția sângelui.

Vitamina B_2 formează două coenzime: flavinmononucleotida (FMN) şi flavinadenin dinucleotida (FAD), care participă în organism la reacții de oxidoreducere catalizate de enzime din clasa oxidoreductazelor (xantin oxidază, succinat dehidrogenaza, glucozoxidaza etc.). Molecula vitaminei B_2 este formată dintr-un heterociclu numit aloxazina şi un rest de ribitol:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



O variantă de sinteză a vitaminei B_2 porneşte de la xilidină şi D-riboză, printr-o succesiune de reactii după cum urmează:



Riboflavina

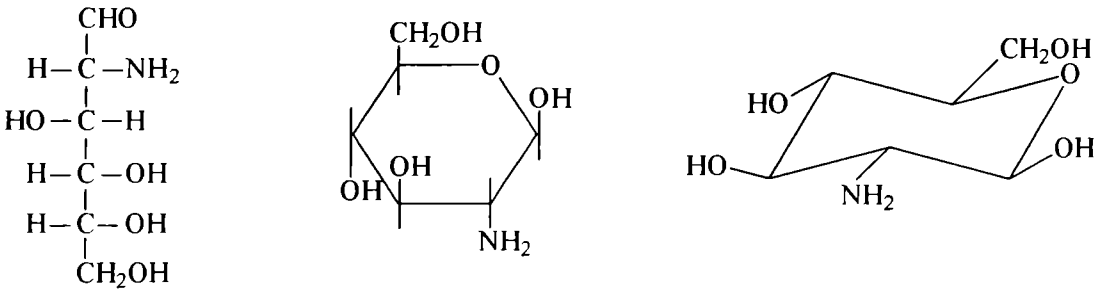
Alături de nucleotide şi nucleoside, componente ale acizilor nucleici, chiar şi aceştia din urmă pot fi consideraţi substanţe naturale înrudite cu monoglucidele, deoarece conţin resturi de D-riboză (ARN) şi de 2-deoxi-D-riboză (ADN), ei constituind una dintre cele patru clase de biomolecule (capitolul IV).

I.2.3.3. Aminoglucidele

Aminoglucidele rezultă prin substituirea unei grupe alcool secundar cu o grupă aminică.

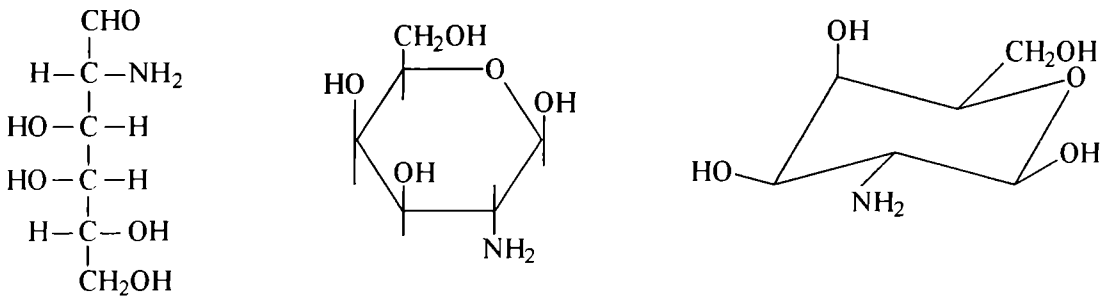
- β-D-Glucozamina se găseşte sub forma poliglucidei structurale chitina, care formează carapacea rezistentă a insectelor şi crustaceelor:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



β–D-2-Glucozamina

- β-D-Galactozamina se găseşte tot sub formă de poliglucid în cartilagii şi mucoase vegetale:

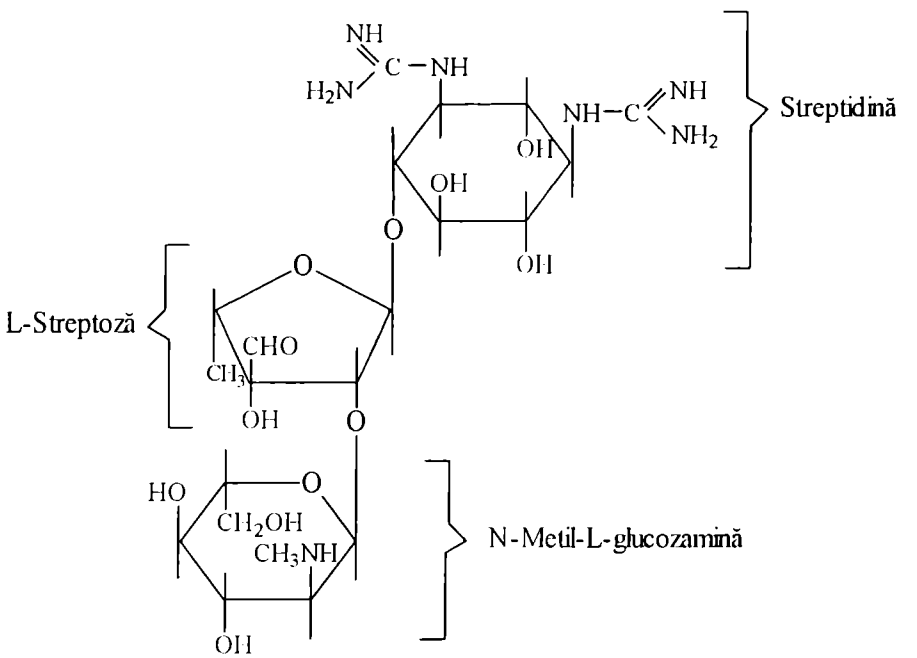


β–D-2-Galactozamina

- Un derivat natural al L-glucozaminei este streptomicina, antibiotic produs de *Streptomices griseus* (Waksman, 1947) şi care poate fi obţinut şi pe cale fermentativă.

Streptomicina are acţiune bacteriostatică asupra bacilului tuberculozei; se foloseşte frecvent şi pentru combaterea germenilor patogeni rezistenţi la peniciline.

Streptomicina are formula moleculară $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$ şi caracter bazic accentuat, fiind formată din trei subunităţi structurale diferite: N-metil-L-glucozamina, L-streptoza (dialdehidă înrudită cu monoglucidele) şi streptidina (derivat al inozitolului):



Streptomicina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

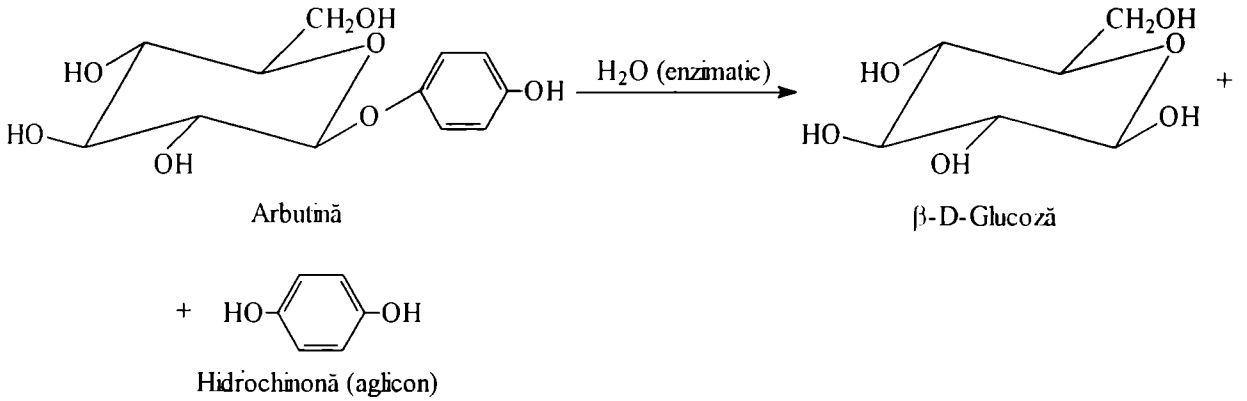
I.2.3.4. Glicozide

Glicozidele (eteri ai glucidelor la grupa OH semiacetalică) sunt răspândiți in plante, având funcții fiziologice specifice; predomină glucozidele (derivate de la glucoză).

Un glicozid este format din două componente: un glucid (mono sau oligoglucid) şi un rest de derivat hidroxilat cu structură neglucidică, numit aglicon.

Agliconii din glicozidele naturale pot fi: mono şi polifenoli, acizi fenolici, cianhidrine (nitrili ai hidroxiacizilor carboxilici), coloranți (ca forma redusă a indigoului) etc.

În stare naturală majoritatea glicozidelor sunt anomeri β. Un exemplu de asemenea compus este arbutina (β-D-glucozidul hidrochinonei):



Arbutină

β-D-Glucoză

Hidrochinonă (aglicon)

Prin hidroliză cu o enzimă specifică (β-glucozidaza) arbutina conduce la β-D-glucoză şi hidrochinonă.

Arbutina este prezentă în cantități mari în frunzele de păr şi în coaja fructelor. Aceasta explică de ce toamna, frunzele părului în loc să se îngălbenească se înnegresc, datorită conținutului în arbutină, care se hidrolizează enzimatic. Hidrochinona rezultată se oxidează în aer, cu formarea unor produşi de degradare de culoare neagră.

În general, enzimele care hidrolizează specific un glicozid şi glicozidul respectiv, se găsesc în părți diferite ale aceleiaşi plante şi nu vin în contact direct decât în anumite stadii de dezvoltare a plantei.

I.3. Oligoglucide

Dintre oligoglucide, cele mai răspândite în natură sunt diglucidele hexozelor.

I.3.1. Diglucide

Diglucidele rezultă prin eliminarea unei molecule de apă între două molecule de monoglucid:

$$2C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$$

După natura grupelor hidroxil care participă la această reacție de eterificare, diglucidele pot fi:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- nereducătoare, cu legătură dicarbonilică, rezultată prin condenasarea hidroxililor glicozidici ai ambelor monoglucide, reprezentantul acestora fiind zaharoza;

- reducătoare, cu legătură monocarbonilică formată cu participarea hidroxilului glicozidic al unei monoglucide şi a unei grupe alcoolice provenită din cel de la doilea monoglucid. În această categorie se includ: maltoza, celobioza, lactoza.

Indiferent de natura legăturii, la stabilirea structurii diglucidului se parcurg aceleaşi etape generale:

a) examinarea proprietăţii reducătoare cu ajutorul reactivului Fehling sau Tollens;

b) hidroliza acidă şi identificarea monoglucidelor componente;

c) determinarea naturii ciclurilor (furanozică sau piranozică) a celor două monoglucide, precum şi a poziţiei hidroxilului alcoolic ale uneia dintre ele, care participă la legătura monocarbonilică;

d) determinarea naturii glicozidice (α sau β) dintre cele două monozaharide, printr-o hidroliză enzimatică specifică (utilizând stereospecificitatea de substrat a enzimelor).

I.3.1.1. Zaharoza

Acesta este cel mai răspândit şi cel mai important diglucid prezent în regnul vegetal. Ea se poate extrage din diverse surse, fiind cunoscută şi sub denumirile de zahăr de trestie sau de sfeclă.

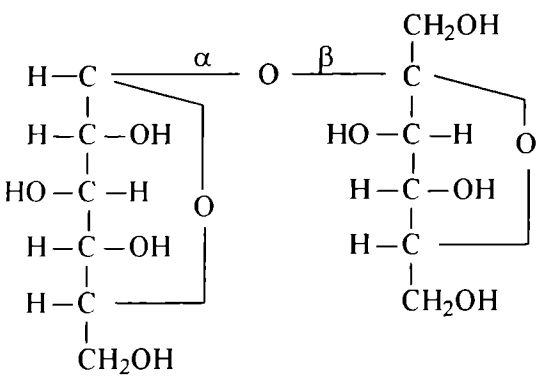
Materia primă pentru obtinerea industrială a zaharozei poate fi rădăcina sfeclei de zahăr (16 – 20% zaharoză) sau tulpina trestiei de zahăr (23 – 24% zaharoză).

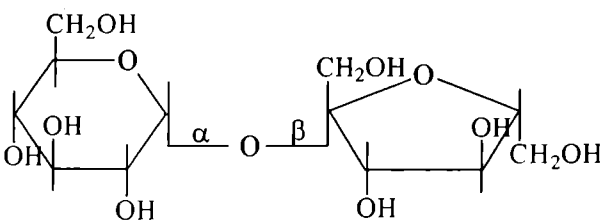
Zaharoza nu reduce reactivul Fehling şi nu formează osazonă cu fenilhidrazina.

Prin hidroliză acidă se transformă într-un mol de D-glucoză şi un mol de D-fructoză.

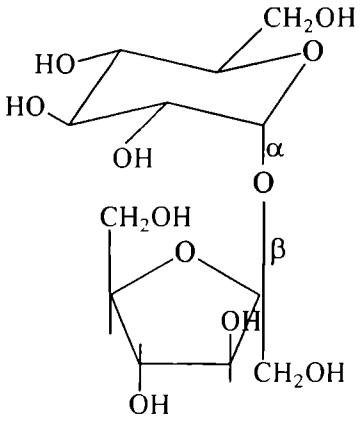
Este hidrolizată secific de două enzime:

- α-glucozidaza (maltaza), specifică legăturii α-glucozidice şi
- β-fructozidaza (invertaza), specifică legăturii β-fructozidice:



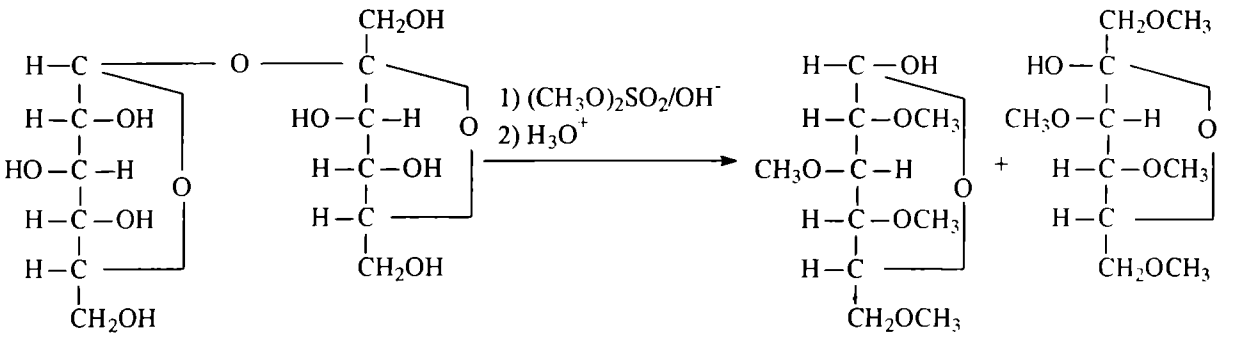


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Zaharoza

Determinarea naturii ciclurilor celor două monoglucide se face prin metoda metilării la maxim (Haworth), urmată de hidroliză:

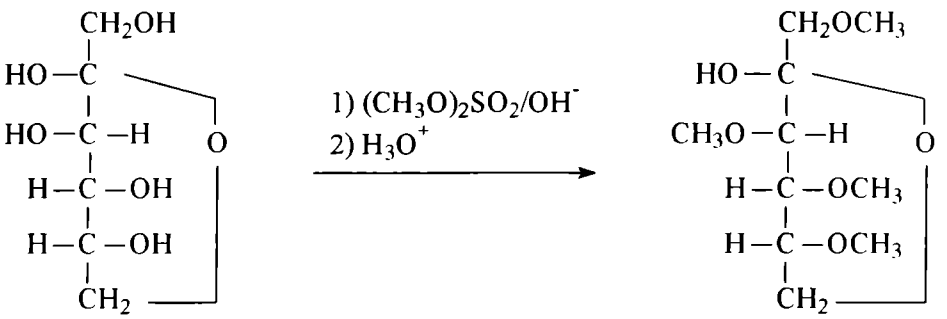


2,3,4,6-Tetrametil-D-glucopiranoza

1,3,4,6-Tetrametil-D-fructofuranoza

Dintre produşii de reacţie s-a observat că 2,3,4,6-tetrametil-D-glucopiranoza este identică cu cea obţinută din α-D-glucoza naturală, supusă metilării la maximum şi apoi hidrolizei, ceea ce denotă natura piranozică a ciclului său.

1,3,4,6-Tetrametil-D-fructoza obţinută de la zaharoză este diferită de produsul de reacţie obţinut de la fructoza naturală prin metilare la maximum, urmată de hidroliză. Acest lucru se datorează faptului că D-fructoza naturală are întotdeauna structură piranozică (mai stabilă), care în aceleaşi condiţii conduce la 1,3,4,5-tetrametil-D-fructoză:



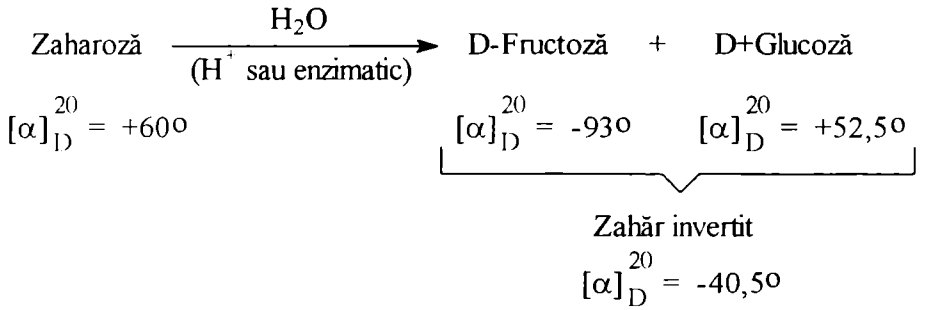
D-Fructopiranoza (naturală)

1,3,4,5-Tetrametil-D-fructopiranoza

Din această deosebire de comportare, rezultă că în zaharoză (ca de altfel şi în alte oligoglucide sau în poliglucide) fructoza are ciclu furanozic. Hidroliza zaharozei (chimică sau enzimatică) poartă denumirea de "invertire a zahărului", iar amestecul echimolecular de D-

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

glucoză şi D-fructoză rezultat se numeşte "zahăr invertit", deoarece soluţia apoasă de zaharoză suferă o inversare a semnului optic:



Biogeneza zaharozei are loc în frunzele plantelor, din produşii fotosintezei; după formare, zaharoza este transportată la diferitele organe ale plantelor.

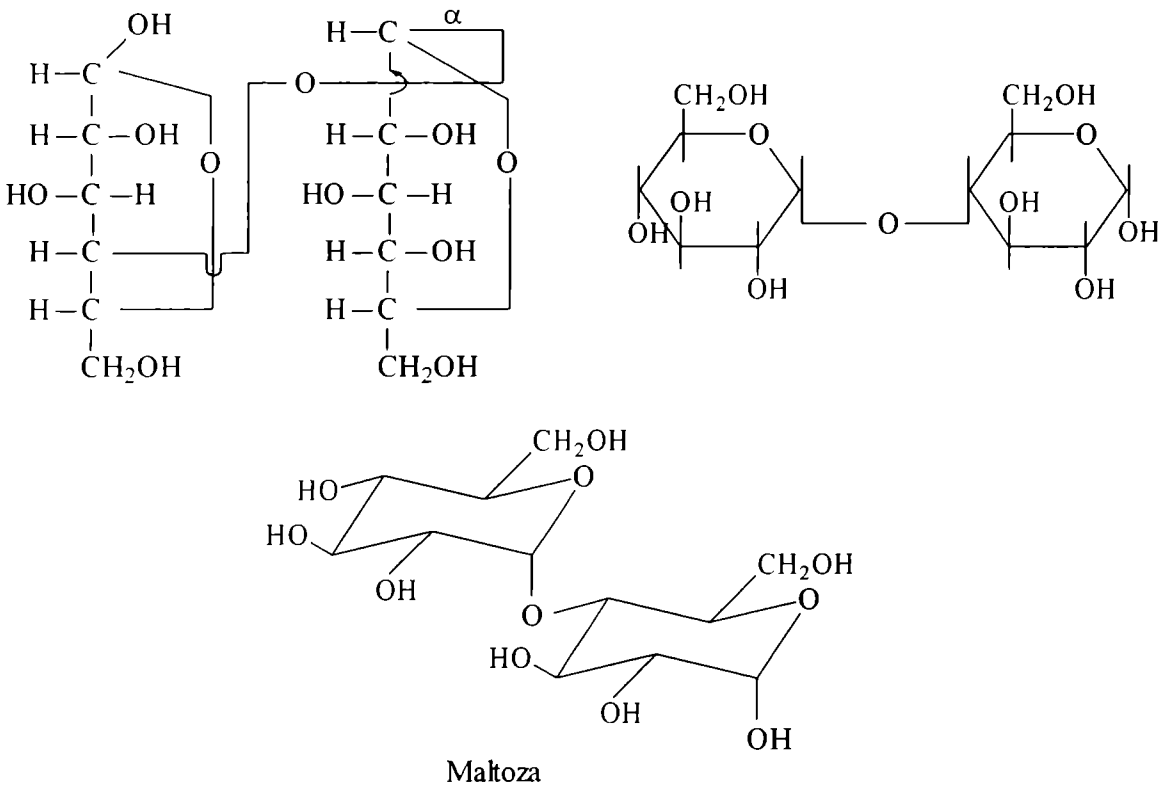
Pentru organismele animale, zaharoza reprezintă o sursă preţioasă de energie metabolică şi o sursă de resturi hidrocarbonate pentru biosinteza constituenţilor celulari, provenind din surse exogene (alimentele cu care se hrănesc oamenii şi animalele).

I.3.1.2. Maltoza

Acest diglucid, denumit şi zahăr de malţ, este produsul principal al hidrolizei enzimatice a amidonului. În stare liberă, maltoza este întâlnită în cantităţi mici în regnul vegetal (ţesuturi bogate în amidon, cartofi, germeni de orz încolţit) şi în mierea de albine.

Maltoza este constituentul structural principal al amidonului ca şi al glicogenului. Diglucidul este solubil în apă, are caracter reducător şi formează osazonă la tratarea cu fenilhidrazină.

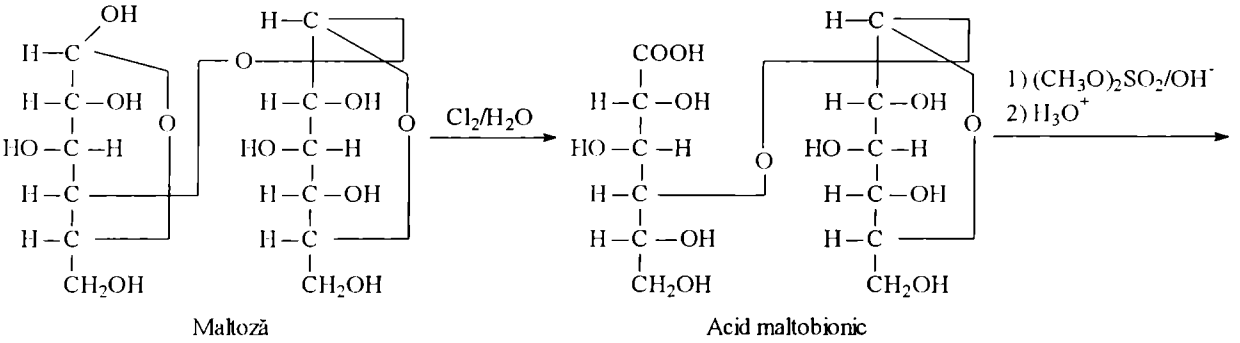
La hidroliză (acidă sau enzimatică), maltoza conduce la doi moli de D-glucoză; este hidrolizată specific de maltază (α-1,4-glucozidază), enzimă prezentă în drojdie.



Maltoza

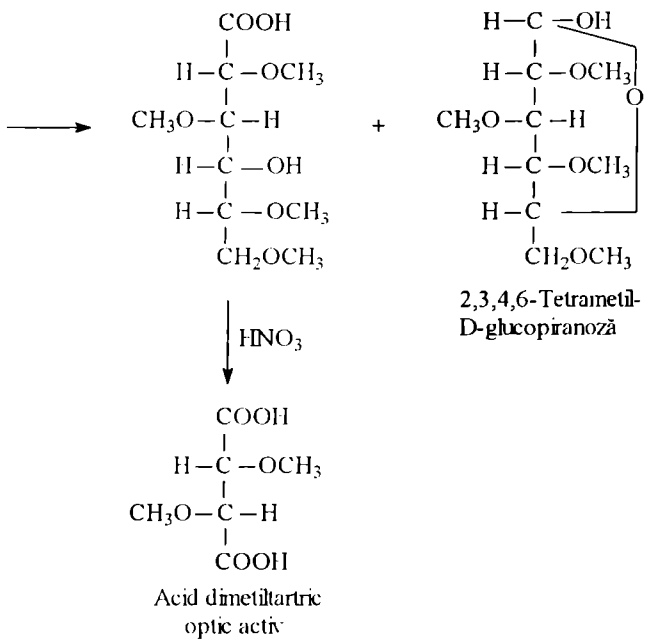
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Natura piranozică a ciclurilor moleculelor de glucoză, ca şi prezenţa la C_4 a grupei alcoolice care participă la formarea legăturii monocarbonilice, au fost determinate printr-o serie de reacţii care includ: oxidarea blândă, metilarea la maximum, hidroliza derivatului metilat şi oxidarea energică a acestuia:



Maltoză

Acid maltobionic



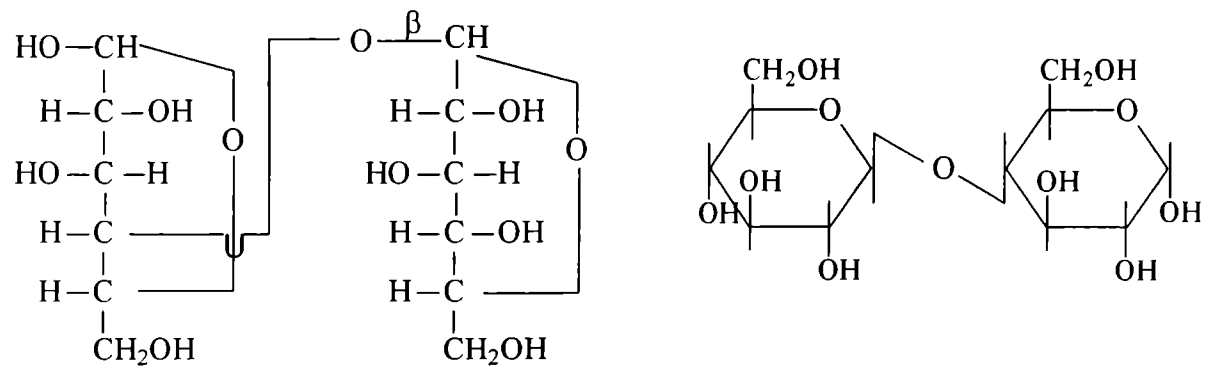
2,3,4,6-Tetrametil-D-glucopiranoză

Acid dimetiltartric optic activ

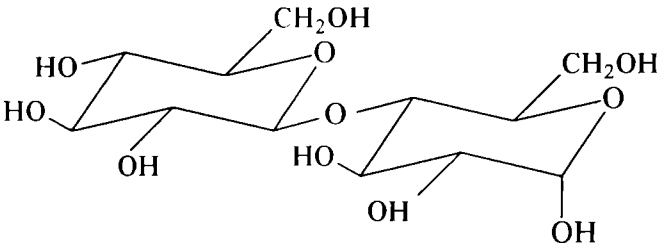
Acidul dimetiltartric optic activ provine de la molecula de D-glucoză care a participat la formarea legăturii monocarbonilice cu hidroxilul de la atomul C_4.

I.3.1.3. Celobioza

Celobioza este de fapt izomerul steric al maltozei, fiind formată din două resturi de D-glucopiranoză legate între ele β-1,4-glicozidic:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Celobioza

Celobioza nu se găseşte în stare liberă în natură, fiind constituentul principal al celulozei din plante; ea se obține prin hidroliza acidă a acesteia, alături de oligoglucide superioare (celotrioză, celotetroză etc.). De asemenea, celobioza se mai găseşte sub formă legată şi în alte ozide prezente în plante (glicozide, laminaran etc.).

Natura legăturii glicozidice din moleculă influențează în mod hotărâtor rolul biologic al amidonului şi celulozei.

Astfel, spre deosebire de amidon (compus din resturi de maltoză), pentru care organismul uman posedă echipamentul enzimatic necesar scindării până la glucoză, celuloza (formată din resturi de celobioză) nu poate servi ca aliment pentru om, căruia îi lipsesc enzimele necesare digestiei sale. În schimb, rumegătoarele posedă în tubul digestiv enzimele necesare metabolizării celulozei.

Prin hidroliza acidă (cu HCl suprasaturat sau cu H_2SO_4 conc.) sau enzimatică (cu β-1,4-glucozidaza), celobioza conduce la doi moli de β-D-glucopiranoză.

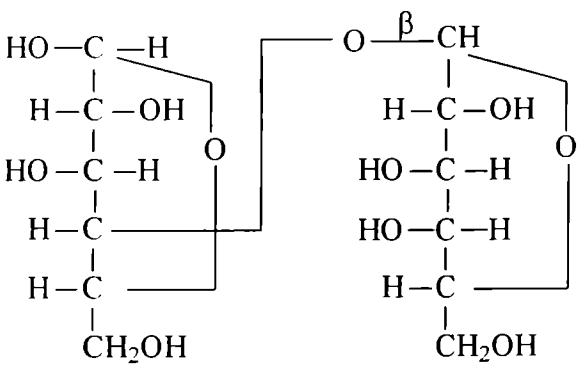
Determinarea caracterului reducător, ca şi a structurii celobiozei se face prin metodele generale descrise şi pentru maltoză.

I.3.1.4. Lactoza

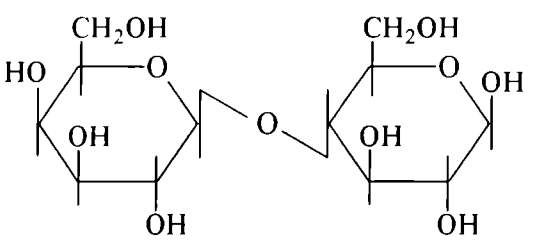
Lactoza (zahărul de lapte) este prezentă în laptele mamiferelor, în cantități variabile (1-8%), în functie de specie. În cantități mici a fost pusă în evidență în urină, ca şi în staminele plantei *Forsythia suspensa*.

Oamenii şi mamiferele, care posedă în intestinul subțire enzima specifică scindării lactozei (lactaza sau β-1,4-galactozidaza), pot utiliza lactoza ca aliment.

Prin scindare hidrolitică (acidă sau enzimatică), lactoza se transformă într-un mol de D-glucopiranoză şi un mol de D-galactopiranoză. Galactoza rezultată este transportată prin circulația sângelui la ficat, unde este transformată în D-glucoză endogenă.

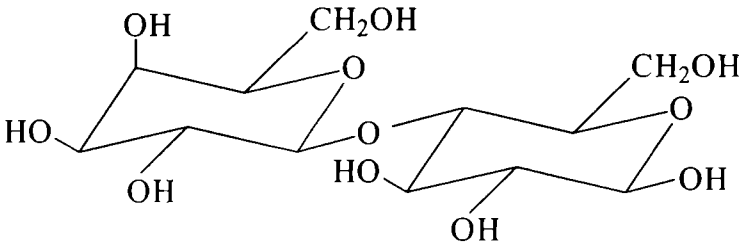


D-Glucoză D-Galactoză



D-Galactoză D-Glucoză

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Lactoza

Determinarea structurii urmează etapele obişnuite pentru diglucidele reducătoare (maltoza, celobioza).

Deşi majoritatea copiilor posedă lactoză intestinală şi pot utiliza lactoza din lapte ca aliment, unii copii şi chiar adulţi, în special orientalii şi cei de rasă neagră, au un nivel redus de β-galactozidază. Din această cauză, majoritatea lactozei din laptele ingerat ajunge netransformată din tractul digestiv în colon. Aici are loc o fermentaţie bacteriană, cu producerea unor cantităţi mari de hidrogen molecular, dioxid de carbon şi acizi iritanţi, producând disfuncţii intestinale. Apare în acest fel galactozemia sau intoleranţa la lapte, care nu poate fi folosit în alimentaţie, deşi este unul dintre cele mai bogate alimente în substanţe nutritive.

În aceste cazuri este utilizat un lapte dietetic, obţinut printr-o scindare prealabilă a lactozei din laptele integral, în reactoare enzimatice, cu β-galactozidază din drojdii sau bacterii.

De asemenea, cantităţi relativ mari de lactoză sunt conţinute în zerul rezultat de la coagularea brânzeturilor. Lactoza conţinută în zer este supusă hidrolizei cu lactază din drojdii sau microorganisme (*Sccharromyces lactis, Aspergillus niger*). Se obţine astfel amestecul de D-glucoză şi D-galactoză, cu solubilitate ridicată şi mai dulce decât lactoza.

I.3.2. Alte oligoglucide

Triglucidele, tretra- şi hexaglucidele se găsesc în cantităţi mici în regnul vegetal sau sub formă de componente ale unor poliglucide, din care rezultă prin hidroliză. Ele se pot obţine şi în laborator, prin sinteză chimică sau biochimică.

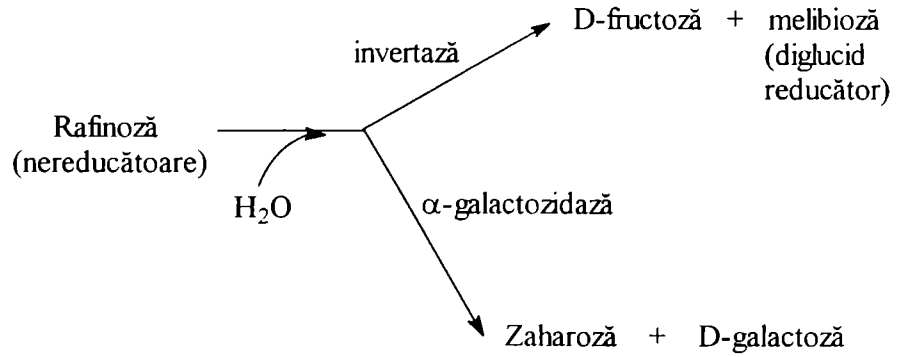
Astfel, rafinoza este o triglucidă nereducătoare, prezentă in sfeclă şi în seminţele de bumbac, ca şi în melasa rezultată la fabricarea zahărului de sfeclă.

Rafinoza se extrage cu apă din faina boabelor de bumbac, după care se precipită cu hidroxid de bariu sau de calciu. Sărurile solide obţinute se descompun, cu obţinerea rafinozei pure.

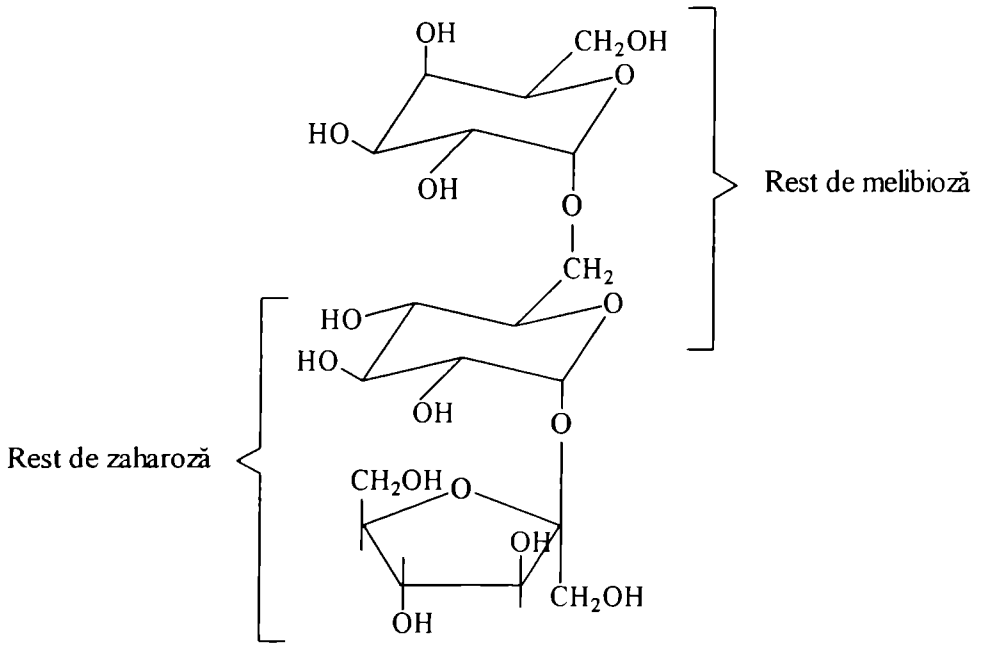
În sfecla de zahăr, rafinoza este conţinută în cantităţi mici (sub 0,05%), în timp ce în melasă ajunge la concentraţii de 4%.

Rafinoza este scindată hidrolitic de două enzime: invertaza din drojdie şi α-galactozidaza din emulsină:

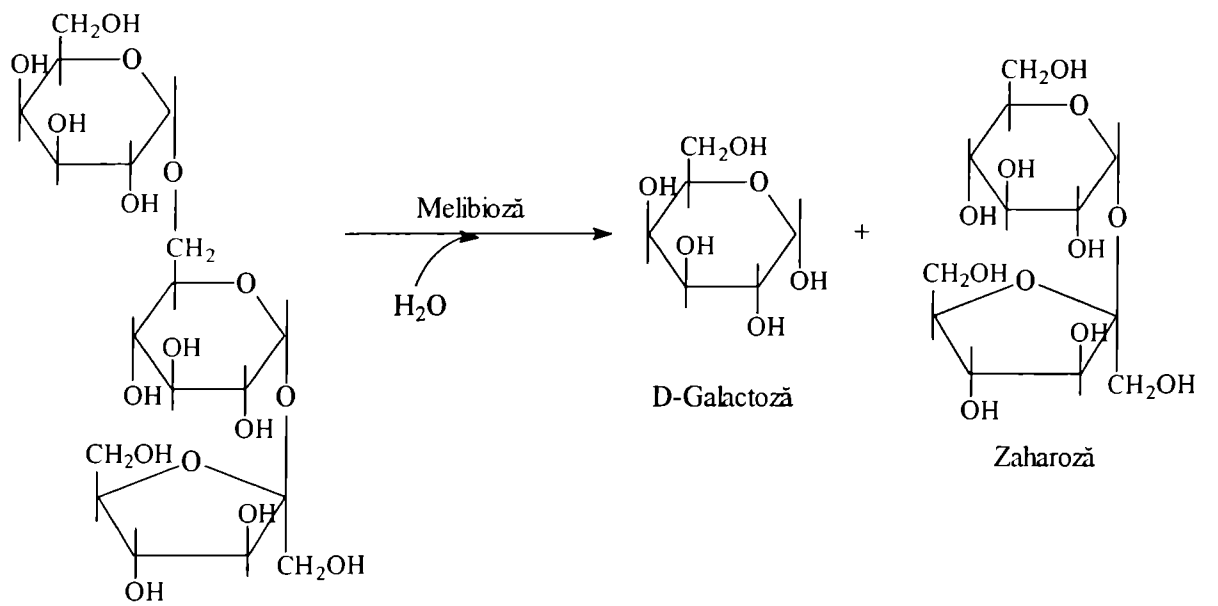
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Deci rafinoza este compusă din trei monoglucide: D-glucoza, D-fructoza şi D-galactoza:



Prezența rafinozei în sfecla de zahăr împiedică cristalizarea zaharozei in procesul de extracție a acesteia. De aceea, în industria produselor zaharoase, rafinoza este tratată cu α-D-galactozidază (melibiază) din *Mortierella vinacea* (ciupercă):



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.4. Poliglucide

Poliglucidele (glicani, polizaharide) sunt foarte răspândite în regnurile vii. Ele pot fi clasificate atât după criterii chimice cât şi biologice (I.1).

În cele ce urmează, vor fi descrise cele mai importante poliglucide, în funcție de rolul lor biologic.

I.4.1. Poliglucide structurale

Aceste polizaharide imprimă țesuturilor vegetale şi animale forma, elasticitatea şi rigiditatea caracteristice, având rol de susținere. Ele sunt distribuite în special în pereții celulelor, dar şi în spațiul intracelular, în pereții vaselor sanguine, în țesuturile de legătură, fiind uneori complexate cu proteinele, sub formă de glicoproteine.

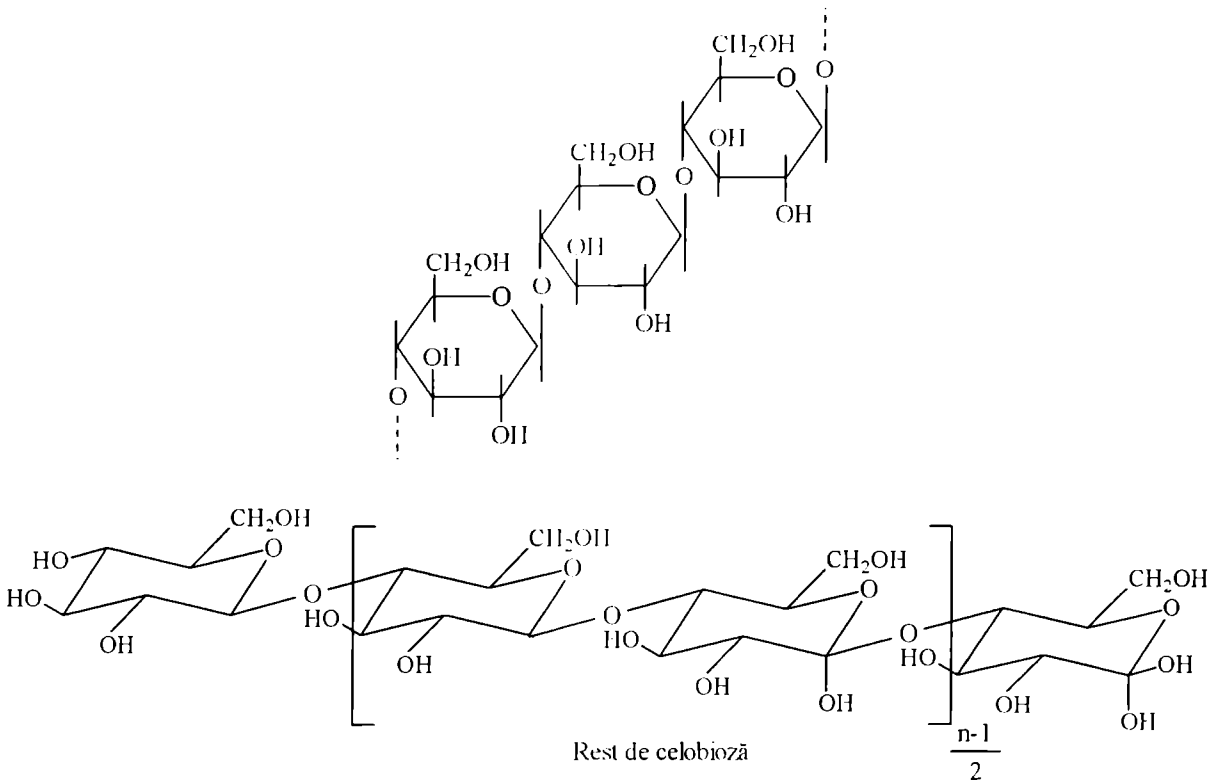
I.4.1.1. Poliglucide structurale din regnul vegetal

În această categorie intră celuloza (cea mai răspândită), dar şi alte poliglucide (gume, mucilagii, materii pectice, dextrani, agarozã, k-carageenan).

Polizaharidele structurale din materia vegetală pot fi homopoliglucide (celuloza, acidul pectic, acidul alginic, dextranul etc.) sau heteropoliglucide (agarul, agaroza, k-carageenanul etc.).

A. Celuloza

Celuloza $(C_6H_{10}O_5)_n$ este o poliglucidă formată din resturi de D-glucopiranoză legate (ca şi în cazul celobiozei, unitatea sa structurală) prin legături 1,4-β-glicozidice. Datorită acestui mod de legare, fiecare ciclu de glucoză din molecula celulozei este răsucit față de cele vecine, formând molecule filiforme:



Celuloza

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Gradul n de polimerizare poate varia între 300 şi peste 3000.

Principalul rol al celulozei este acela de material de construcţie al pereţilor celulelor vegetale. În plante, celuloza se găseşte sub formă de fibre, amestecate cu materii străine (incruste) ca: oliglucide, grăsimi, răşini, coloranţi, lignină, săruri minerale. Celuloza se mai găseşte şi în spaţiul extracelular al unor nevertebrate inferioare şi se poate forma în mediile de cultură ale unor bacterii (*Acetobacter xilinium*) dacă acestea conţin hexoze.

Pachetele dense de fibrile de celuloză din pereţii celulari ai plantelor sunt cimentate prin trei materiale polimere (incruste): hemicelulozele, predominante (formate din polimeri ai D-xilozei), pectina (polimer al metil-D-galacturonatului) şi extensina (o proteină legată covalent de fibrele celulozice).

Dintre incruste, lemnul conţine şi o substanţă polimeră, lignina, în proporţie de 25% în greutate; lignina este formată din polimeri ai unor alcooli alchil-aromatici.

Cea mai pură celuloză se găseşte în fibrele vegetale din perii seminţelor de bumbac şi din in. În funcţia de poziţia geografică, materia primă pentru extracţia industrială a celulozei poate fi lemnul sau materiale ca: bumbac, paie, stuf, ierburi.

Celuloza conţinută în lemn nu este o substanţă unitară, fiind un amestec de trei varietăţi, în funcţie de gradul n de polimerizare:

- α-celuloza (insolubilă în soluţie de NaOH 17,5%), cu n>100;
- β-celuloza (solubilă în soluţie de NaOH), cu n=10–100;
- γ-celuloza (amestec de oligoglucide), cu n<10.

Cu cât conţinutul în α-celuloză este mai ridicat, calitatea materialului este mai bună.

Celuloza din lemn poate avea gradul de polimerizare n = 550-1250, iar fibrele de bumbac valori mai mari (n=1200-1300). Bumbacul neînălbit are cel mai mare grad de polimerizare.

Cel mai mic grad de polimerizare îl are mătasea viscoză (artificială), cu n=100-500.

Rezistenţa mecanică a fibrelor este cu atât mai mare cu cât gradul de polimerizare este mai înalt, datorită formării unui mare număr de legături de hidrogen între fibre.

Degradarea biochimică a celulozei are loc în sol, sub influenţa unor microorganisme, atât în condiţii aerobe, cât şi anaerobe.

În condiţii aerobe, produşii finali de reacţie sunt apa şi dioxidul de carbon, pe când în condiţii anaerobe se formează acizi graşi, dioxid de carbon, hidrogen şi metan.

Lanţul polimer al celulozei se poate scinda biochimic sub influenţa complexului enzimatic numit celulază; mai întâi se formează celobioza şi apoi D-glucoza. Atât celobioza cât şi glucoza se formează în tubul digestiv al rumegătoarelor pentru care celuloza este un aliment esenţial, spre deosebire de om şi alte animale care nu posedă complexul enzimatic necesar zaharificării celulozei.

Există două procedee industriale pentru extracţia celulozei din lemn:

1° Procedeul cu bisulfit, în care cojile tocate se încălzesc sub presiune cu o soluţie de bisulfit de calciu, când se produce dezagregarea lemnului şi dizolvarea incrustelor. Se obţine o celuloză pură, insolubilă, care se separă şi se prelucrează.

Leşiile bisulfitice sunt fermentate cu drojdii pentru obţinerea etanolului industrial.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2° Metoda impropriu denumită "procedeu cu sulfat" foloseşte pentru dezagregarea lemnului un amestec de soluţii de hidroxid de sodiu 6% şi sulfură de sodiu 2% la 170-175°C şi 7-8 at., timp de 4-6 ore.

Celuloza astfel obţinută este mai putin pură, având o culoare brună; rezistenţa sa mecanică ridicată o recomandă pentru confecţionarea ambalajelor.

Determinarea structurii celulozei s-a făcut urmând mai multe etape:

- hidroliza cu HCl suprasaturat (Willstaetter) conduce la D-glucoză;
- hidroliza acidă parţială are ca rezultat obţinerea unui amestec de D-glucoză şi oligoglucide (celobioză, celotrioză, celotetroză), toţi produşii de reactie având o putere rotatorie redusă (datorită naturii β-glicozidice a legăturilor dintre moleculele de D-glucoză).

Determinarea formulei brute a arătat că celuloza rezultă prin policondensarea glucozei:

$$nC_6H_{12}O_6 \longrightarrow (n-1)H_2O + (C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$$

Molecula de apă legată de macromolecula celulozei nu poate fi decelată decât la analiza elementară, ceea ce arată că formula $(C_6H_{10}O_5)_n$ este destul de exactă.

Prin investigarea cu raze X a celulozei s-a observat că aceasta se comportă în mare ca o substanţă cristalină. Spre deosebire însă de cristalele unor molecule mici care pot cuprinde în celula elementară una sau mai multe molecule, macromolecula celulozei se prelungeşte în mai multe celule elementare. Aceste porţiuni numite microcristalite, în care fibrele sunt aşezate paralel, sunt intrerupte de zone cu o orientare neregulată, amorfă.

Gradul de polimerizare n poate fi determinat fie prin metode fizice, fie prin metode chimice.

- O metodă simplă este cea viscozimetrică (H. Staudinger), bazată pe relaţia dintre viscozitatea intrinsecă (η) a soluţiei de celuloză şi masa moleculară (M):

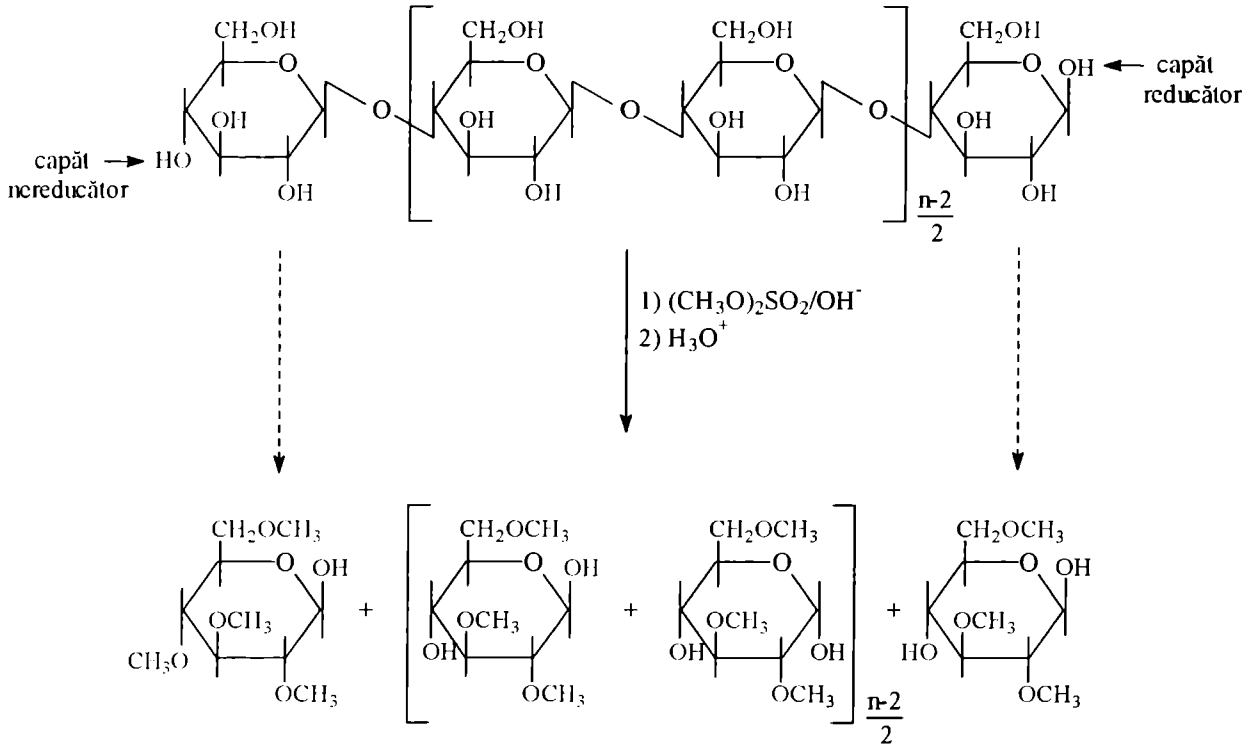
$$[\eta] = K_m \cdot M$$

Fiind insolubilă în solvenţi uzuali, celuloza se dizolvă în reactivul Schweitzer (cuproxam), obţinut prin dizolvarea $Cu(OH)_2$ într-o soluţie concentrată de amoniac, când se formează hidroxidul tetraaminocupric: $[Cu(NH_3)_4]^{2+} \cdot 2OH^-$.

Pentru determinarea constantei K_m (diferită în funcţie de celuloză), se determină masa moleculară a unui derivat al celulozei prin metoda osmotică şi se compară cu rezultatele obţinute prin metoda viscozimetrică aplicată la aceeaşi celuloză, nemodificată.

- Metoda grupelor marginale este de fapt o extindere a metodei metilării la maximum (Haworth) aplicată şi la determinarea structurii altor glucide. Ea constă în metilarea totală cu dimetilsulfat în mediu alcalin, urmată de hidroliză acidă, când se rup doar legăturile eterice de natură glicozidică:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

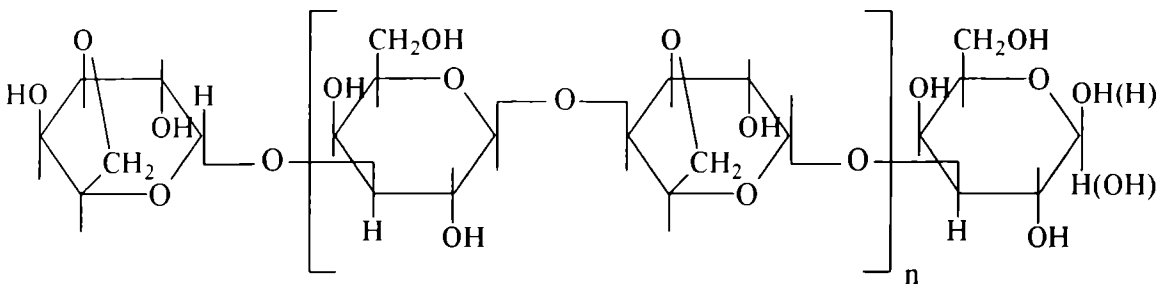


Se formează o mare cantitate de 2,3,6-trimetil-β-D-glucopiranoză (din mijlocul lanțului şi de la capătul reducător al macromoleculei) şi o cantitate mică de 2,3,4,6-tetrametil--β-D-glucopiranoză (de la capătul nereducător). Din raportul acestor derivați metilați se deduce gradul mediu (n) de polimerizare.

B. Alte poliglucide structurale din regnul vegetal

1° Agarul este un heteropoliglucid, izolat din unele specii de alge marine (*Gelidium amansii*). Poliglucidul conține lanțuri liniare, reticulate, în care resturile de D-galactoză alternează cu resturi de 3,6-anhidro-L-galactoză. Agarul este format de fapt din două componente: agaropectina (încărcată electric) şi agaroza (neutră electric).

Agaroza (utilizată în cromatografie şi electroforeză) se obține prin extracția acidă a agarului, sau prin precipitarea lui cu polietilenglicol. Unitatea structurală a agarozei este agarobioza:



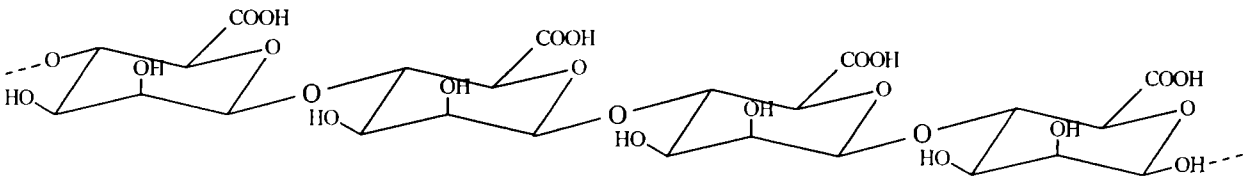
Agarobioza

Gelurile apoase de agaroză, denumite comercial Sepharoză, sunt foarte stabile, nu-şi modifica volumul în contact cu apa, sunt biocompatibile şi se folosesc în industriile alimentară şi farmaceutică, pentru obținerea unor produşi alimentari de fermentație, pentru biosinteza unor medicamente, dar şi pentru separări cromatografice şi electroforetice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

2° Acidul alginic

Acest poliuronid a fost izolat din alge brune *Phaeophyceae*, fiind constituentul poliglucidic major al acestora. Acidul alginic este un copolimer al acizilor D-manuronic şi D-guluronic, legaţi 1,4-β-glicozidic; în catena principală predomină resturile de acid D-manuronic:



Acidul alginic este solid, incolor, insolubil în apă, dar solubil în soluţii de hidroxizi şi carbonaţi alcalini, cu care formează săruri solubile.

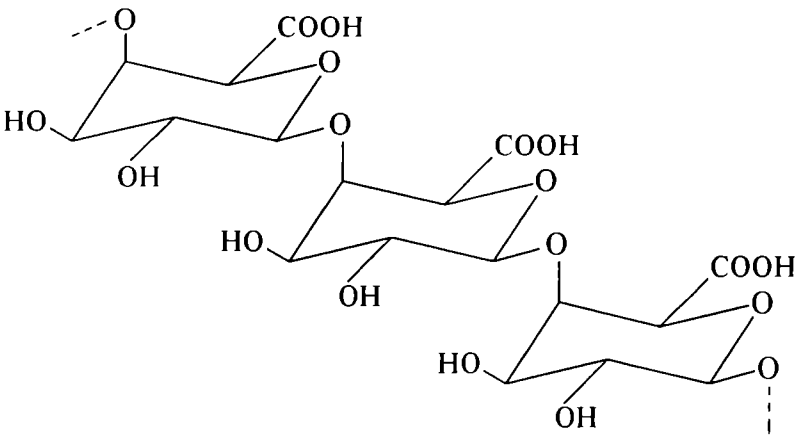
Sărurile formate cu cationi polivalenti (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}) sunt insolubile.

Alginaţii solubili se utilizează în industria farmaceutică pentru prepararea pansamentelor gastrice, iar cei insolubili se utilizează ca suport pentru imobilizarea enzimelor şi celulelor utilizate în bioreactoarele din industria alimentară (de exemplu, pentru fabricarea berii şi etanolului de uz alimentar).

De asemenea, acidul alginic este utilizat ca apret în industria textilă, ca stabilizator pentru băuturi răcoritoare, creme şi îngheţate, pentru prepararea cimenturilor dentare, a filmelor şi emulsiilor fotografice.

3° Acidul pectic

Un poliuronid simplu este acidul pectic, format din resturi de acid D-galacturonic, legate 1,4-β-glicozidic, în care o parte din grupele COOH sunt esterificate cu metanol, iar altă parte – neutralizate cu ioni de Ca^{2+} şi Mg^{2+}.



Acid pectic (fragment)

Acidul pectic este component al pectinelor (solubile în apă la cald), prezente în cantităţi mari în sâmburii de mere, pere, gutui, zmeură, fragi etc. şi se utilizează la fabricarea gemurilor şi jeleurilor, deoarece formează geluri stabile la încălzirea cu soluţii apoase de zaharoză slab acidulate.

Masa moleculară a acidului pectic este dependentă de sursa naturală şi variază în domeniul 25-100 kDa.

Soluţiile viscoase de pectine se utilizează şi la fabricarea cleiurilor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

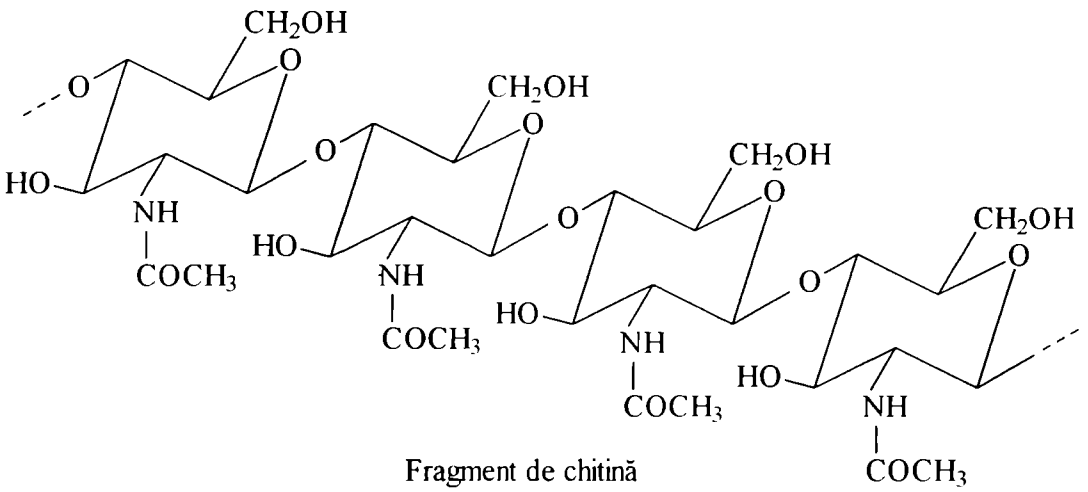
1.4.1.2. Poliglucide structurale din regnul animal

Poliglucidele care fac parte din această clasă sunt complexate, prin legături ionice, cu proteinele animale, formând mucopoliglucide. În general, componenta poliglucidică este un heteropoliglucid (glucozaminoglican), predominantă cantitativ.

Rolul esențial al mucopoliglucidelor constă în cimentarea țesuturilor conjunctive (din cartilagii, piele, tendoane, pereții vaselor sanguine), protecția mecanică a aparatului digestiv, protecția organismului împotriva microorganismelor patogene, precum şi lubrifierea oaselor.

A. Chitina este un mucopoliglucid neutru, care intră în compoziția carapacelor insectelor, homarilor, viermilor, racilor, crabilor, moluştelor etc., cantități mici fiind identificate şi în unele alge.

Chitina este o substanță solidă, insolubilă în apă şi în solvenți organici, fiind formată din resturi de 2-N-acetil-D-glucozamină, legate β-1,4-glicozidic:



Fragment de chitină

Determinarea structurii s-a făcut prin scindare hidrolitică, acidă şi enzimatică:

- prin hidroliză totală cu HCl suprasaturat se obține acid acetic şi clorhidrat al 2-D-glucozaminei;

- prin hidroliză cu chitinaza din bacterii sau din sucul gastric al melcilor, chitina se transformă în N-acetil-2-D-glucozamină, cu caracter reducător.

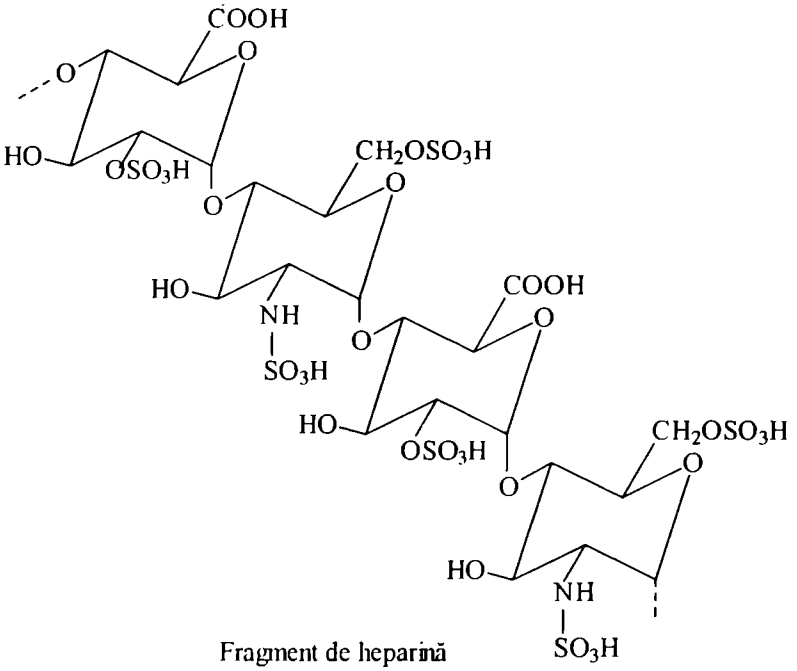
Hidroliza parțială cu HCl conc. produce o dezacetilare parțială a chitinei; se obține chitosanul, poliglucid cu grad variabil de dezacetilare şi cu proprietăți bazice.

Chitina şi chitosanul se utilizează frecvent în cromatografia de adsorbție, în cromatografia de afinitate şi pentru efectuarea unor reacții pe suport solid.

B. Heparina este un glicozaminoglican sulfatat parțial, cu proprietăți de anticoagulant al sângelui.

În molecula heparinei alternează acidul 2-sulfat-D-glucuronic şi 6-sulfat-2-N-sulfo-D-glucozamină, legate α-1,4 glicozidic; 7 din 8 resturi de acid D-glucuronic apar sub formă de 2-sulfat:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Fragment de heparină

Heparina nu este constituent al țesuturilor conjunctive, ea formându-se aproape exclusiv în granulele intracelulare ale celulelor din pereții arterelor, în ficat, timus, plămâni, splină. Acest poliglucid este o substanță solidă, incoloră, solubilă în apă, având caracter acid.

Heparina este un anticoagulant care inhibă coagularea sângelui, prevenind formarea cheagurilor, cu aplicații medicale.

Principala sursă naturală de heparină este reprezentată de ficatul şi plămânii de bovine.

I.4.2. Poliglucide de rezervă

Poliglucidele de rezervă se formează prin metabolizarea în celulele vii a excesului de monoglucide, fiind stocate în citoplasmă.

În caz de nevoie, organismele le pot folosi ca sursă de energie şi ca furnizori de catene hidrocarbonate pentru biosinteza proteinelor şi lipidelor.

I.4.2.1. Poliglucide de rezervă din regnul vegetal

1° Amidonul este un ozid stocat sub formă de granule în tuberculi sau în semințele unor plante (cartofi, cereale etc.).

În semințele plantelor în curs de germinare, amidonul este hidrolizat sub actiunea maltazei (α-1,4-glucozidaza), furnizând astfel plantei glucoza necesară. Grăunțele de amidon se formează în frunzele vegetalelor clorofiliene sub acțiunea luminii solare, în cursul fotosintezei.

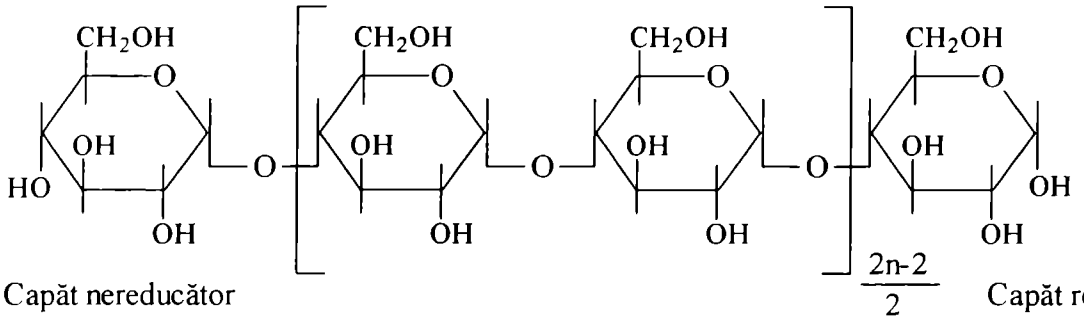
Digestia amidonului în organismele animale constă într-o hidroliză în două etape. Astfel, într-o primă etapă, sub efectul amilazei din salivă se formează maltoză. În continuare, la nivel intestinal, maltoza este hidrolizată la glucoză de către maltaza pancreatică. Astfel se explică de ce acest poliglucid este un factor nutritiv important pentru animale.

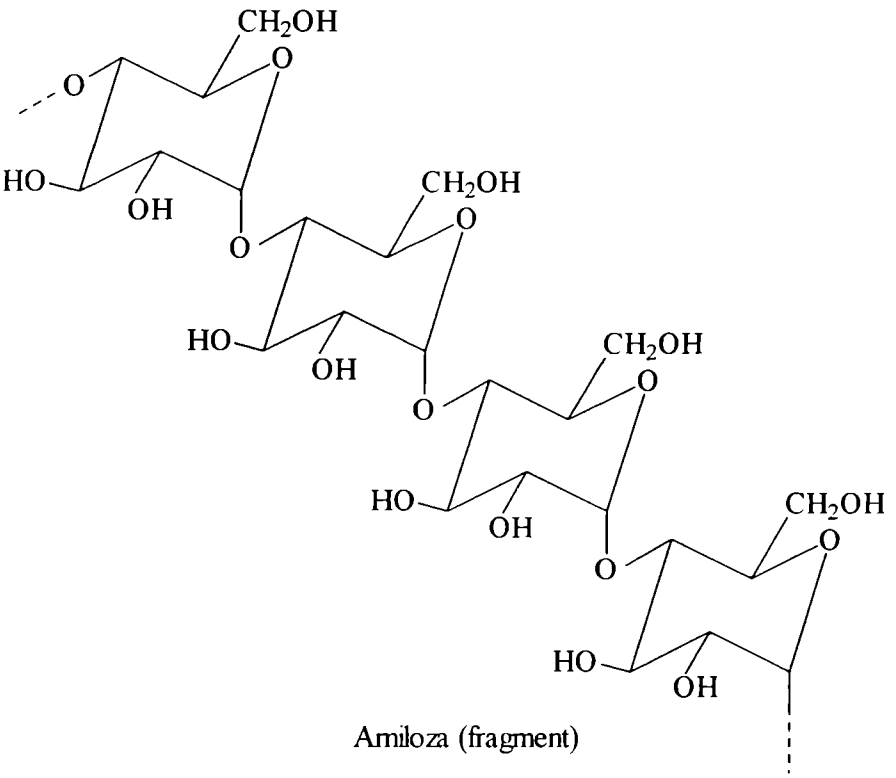
În ceea ce priveşte structura, amidonul nu este o substanță unitară, fiind format din două componente: amiloza (10-20%), solubilă în apă şi care dă o coloraţie albastră intensă cu soluțiile de iod, şi amilopectina (80-90%), insolubilă în apă, care se colorează în violet-purpuriu la tratarea cu iod.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Amiloza este un polimer format în principal din resturi de D-glucopiranoză legate 1,4-α-glicozidic, având ca unitate structurală maltoza. Catenele amilazei conțin, în funcție de specia vegetală, 300-1000 unități de glucoză.

Soluțiile apoase de amiloză au rotația optică α_D=+220°.



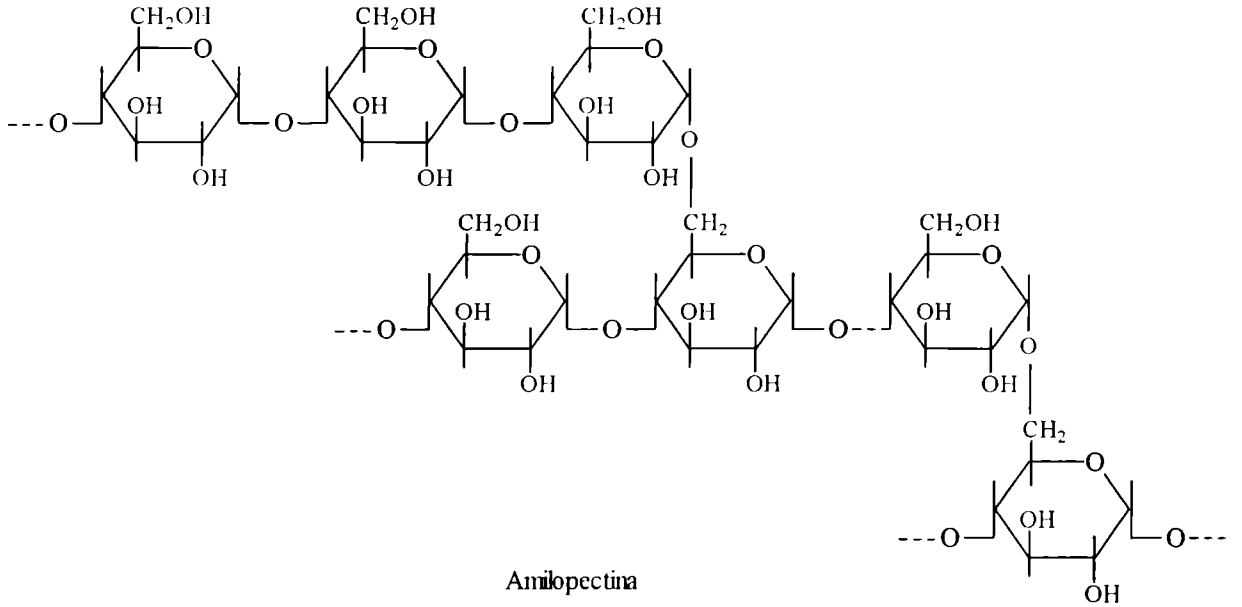


Determinarea structurii ca şi a gradului de polimerizare (n) se face în mod asemănător cu cel de la celuloză (prin metilarea la maximum urmată de hidroliză şi dozarea fragmentelor de D-glucoză tri- şi tetrametilată).

Amilopectina are o structură tridimensională, ramificată, din care cauză este partea insolubilă a amidonului. Acest poliglucid este responsabil de obținerea unor soluții viscoase la încălzirea amidonului cu apa, când rezultă coca utilizată în panificație.

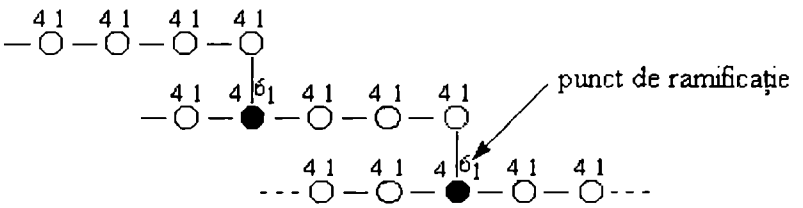
Molecula amilopectinei este compusă din catene liniare, de câte 24 resturi de D-glucoză legate 1,4-α-glucozidic (ca la amilază). La intervale de 20 – 25 unități de glucoză, are loc o ramificare prin legături 1,6-α-glucozidice între două catene liniare:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Amilopectina

Într-o schemă simplificată, această structură poate fi reprezentată astfel:

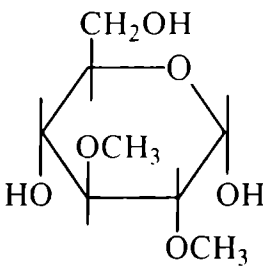


O = unități de glucoză ;

1,4,6 = puncte de legătură între unitățile de glucoză

Existența punctului de ramificație din molecula amilopectinei se poate demonstra pe două căi :

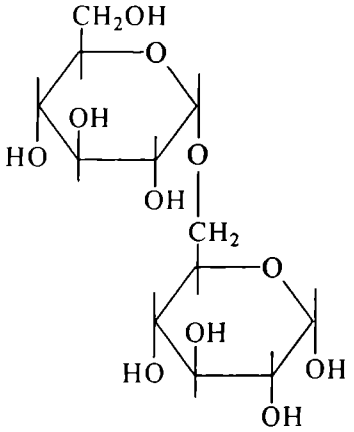
- aplicând metoda metilării la maximum, urmată de hidroliză acidă, din punctul de ramificație se obține 2,3-dimetil-D-glucoza ;



2,3-Dimetil-D-glucoza

- hidrolizând amilopectina cu ajutorul enzimei oligo-1,6-glucozidaza, se obține izomaltoză (izomer steric al maltozei, cu legătură α-1,6-glicozidică) :

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Izomaltoză

Ciclodextrinaza (o enzimă din *Bacillus macerans*) poate segmenta lanțurile poliglucidice ale amidonului, transformându-le în oliglucide, pe care apoi le ciclizează. Compușii obținuți se numesc dextrine ciclice (dextrine Schardinger). Închiderea ciclului are loc prin formare de legături α-1,4-glicozidice dintre capătul reducător și cel nereducător al lanțului oliglucidic. Neavând grupe OH glicozidice libere, ciclodextrinele sunt nereducătoare și, spre deosebire de amidon, nu pot fi scindate de β-amilază decât în prezența ciclodextrinazei. Deci acțiunea ciclodextrinazei este reversibilă.

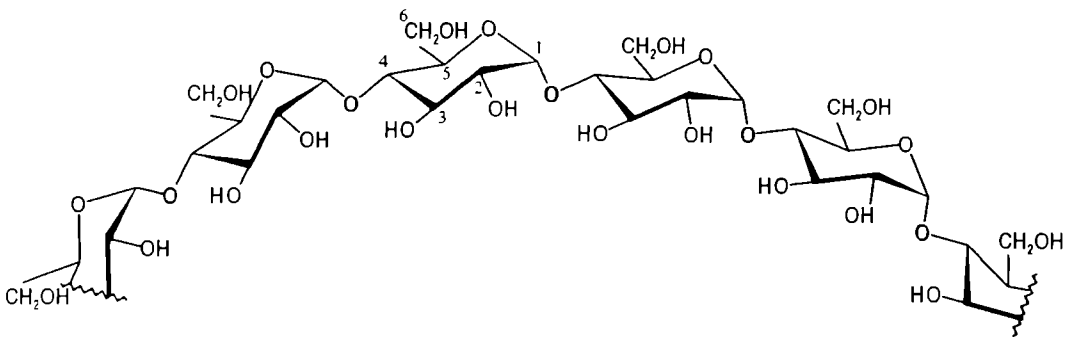


Fig. I.1 Fragment din lanțul inelar al unei ciclodextrine

După numărul de resturi de glucoză din ciclu, ciclodextrinele pot fi: α-ciclodextrine (6 resturi), β-ciclodextrine (7 resturi), γ-ciclodextrine (8 resturi).

Conformația spațială a ciclodextrinelor are formă toroidală, ceea ce determină formarea unei cavități în moleculele lor. În consecință, ciclodextrinele prezintă proprietăți specifice (efecte catalitice, formare de compuși de incluziune etc.).

Hidroliza enzimatică a amidonului

Amidonul poate fi hidrolizat specific sub influența a două enzime: α și β amilaza, care se găsesc în țesuturi animale și vegetale.

Hidroliza enzimatică a amidonului este importantă atât pentru metabolizarea acestuia cât și pentru industria alimentară (obținerea de bere, etanol, produse zaharoase, băuturi, sucuri de fructe) sau în industria textila (la tratarea fibrelor de bumbac).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Atât α- cât şi β-amilaza hidrolizează amidonul la maltoză şi 30-40% produşi insolubili ("dextrine limită").

α-Amilaza se găseşte în regnul animal (salivă, suc pancreatic) ca şi în unele mucegaiuri. Se mai numeşte şi enzimă dextrinogenă şi este o endohidrolază (scindează lanţurile poliglucidice din amidon începând din orice punct al acestora, dar ocolind punctele de ramificare). α-Amilaza este sensibilă în mediu acid şi se denaturează la pH = 3,3.

β-Amilaza se găseşte în regnul vegetal: bob de orz încolţit (malţ), soia, cartof dulce (*Batatus edulis*). Este numită enzimă zaharogenă şi face parte din categoria exohidrolazelor, pentru ca scindează lanţurile poliglucidice din amilază şi amilopectină începând de la capătul nereducător al acestora, dar ocolind punctele de ramificare. Se denaturează la 70°C.

Mecanismul hidrolizei enzimatice

A. Acţiunea β-amilazei

β-Amilaza catalizează hidroliza legăturilor α-1,4-glicozidice din amiloză, pe care o hidrolizează doar în proporţie de 70%. Hidroliza amilozei este completă doar în prezenţa enzimei Z, cu specificitate pentru legăturile β-glicozidice.

De aici rezultă concluzia că amiloza nu are o structură complet liniară; din loc în loc, pe lanţurile liniare sunt legate molecule de D-glucoză prin legături β-glicozidice cu grupa OH de la C_3 a unui rest de glucoză din catena principală.

Din amilopectină, β-amilaza desprinde molecule de maltoză de pe lanţurile liniare, începând de la capătul lor nereducător şi ocolind punctele de ramificaţie. Rezultă un amestec de maltoză şi β-dextrine insolubile, cu masă moleculară mare, care se deosebeşte de amilopectină prin catenele de ramificaţie mai mici cu câte 2-3 resturi de glucoză.

Punctele de ramificare (legăturile α-1,6) sunt hidrolizate de enzime de deramificare, ca enzima R din cartofi. Enzime de deramificare se mai gasesc în muşchi şi în drojdie.

B. Acţiunea α-amilazei

Sub influenţa α-amilazei, atât din amiloză cât şi din amilopectină, se desprind molecule de maltoză, din orice punct al lanţurilor poliglucidice liniare, cu ocolirea punctelor de ramificaţie. Alături de maltoză se formează şi α-dextrine insolubile, care pot fi scindate cu enzima R din cartofi.

Aplicaţii industriale ale hidrolizei enzimatice a amidonului

Amidonul (din cereale, cartofi, porumb) este o materie primă pentru obţinerea berii şi a etanolului de uz alimentar.

Astfel, în zaharificarea cu β-amilază, suspensia apoasă de amidon se tratează cu malţ (boabe de orz încolţit, care conţin β-amilază) la 55-65°C, timp de 20 minute. Se obţine un amestec format din 70-80% maltoză şi 20-30% dextrine. De aici se despart cele două linii principale:

- pentru bere, amestecul se limpezeşte cu hamei, se filtrează şi se încălzeşte la ≥80°C (când β-amilaza este denaturată). Amestecul se răceşte şi se fermentează cu drojdie de bere

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

(*Saccharomyces cerevisiae*). Rezultă berea, slab alcoolizată, colorată şi cu gust amărui (datorită dextrinelor);

- pentru etanol, amestecul de reacţie rezultat la zaharificarea cu β-amilază se supune fermentaţiei cu drojdie la rece, când β-amilaza continuă să fie prezentă în mediu. Drojdia de bere conţine un complex enzimatic care poate deramifica dextrinele, hidrolizând maltoza la glucoză, iar aceasta este fermentată la etanol:

$$\text{Dextrine} \longrightarrow \text{Maltoză} \xrightarrow{\text{Glucoamilaza}} \text{Glucoză} \longrightarrow \text{Etanol}$$

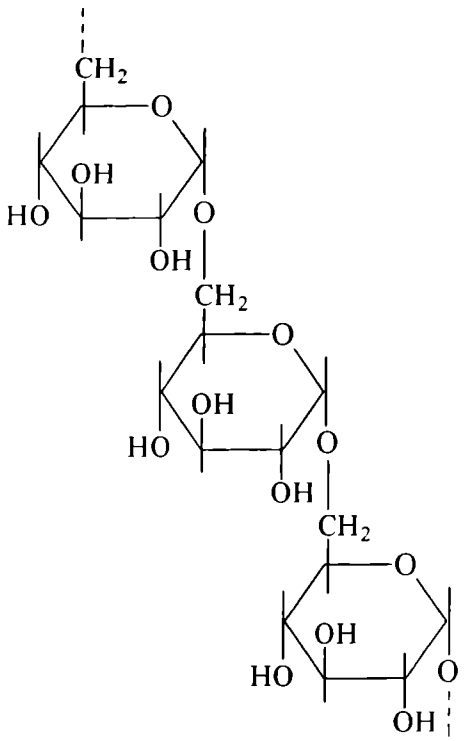
După distilare, se obţine etanol 95%, care poate fi utilizat în industria alimentară, a medicamentelor, a cosmeticelor etc.

În industria textilă, firele de bumbac utilizate în procesul de ţesere sunt lipite prin impregnare cu clei de amidon şi gelatină, pentru a le creşte rezistenţa la tracţiune şi la factori abrazivi (de tocire).

După ţesere, amidonul este îndepărtat prin operaţia de "deslipire", care utilizează hidroliza cu α-amilază din surse microbiologice (*Bacillus amyloliquefaciens*).

2° Dextranii sunt glucani care nu se găsesc în stare liberă, dar se formează în procesul de extracţie a zaharozei din sfecla de zahăr, dacă instalaţiile sunt contaminate cu bacterii din grupa *Leuconostoc*.

Dextranii au macromolecule liniare, formate din resturi de D-glucopiranoză legate 1,6-α-glucozidic:



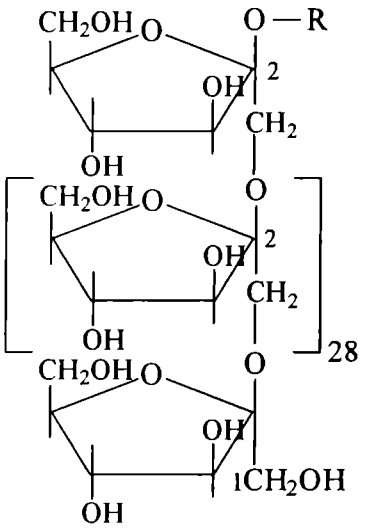
Având o consistenţă gelatinoasă, dextranii împiedică cristalizarea zaharozei; ei se folosesc ca materie primă pentru obţinerea unor adsorbenţi cromatografici, ca suporturi pentru enzime şi ca înlocuitori de plasmă sanguină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3° Inulina este un fructozan de rezervă din regnul vegetal, mai puțin răspândit decât amidonul, mai ales în familiile compositae şi liliaceae, în care se concentrează mai ales toamna, înlocuind o parte din amidon. Astfel, cantități apreciabile de inulină se găsesc în rădăcinile de cicoare şi de nap porcesc, în dalie şi în iarbă mare.

Inulina este solidă, albă, greu solubilă în apă rece şi solubilă în apă la fierbere, în care se extrage. Este nereducătoare, levogiră (are $[\alpha]_D^{20} = -40,2^\circ$) şi este hidrolizată cu inulază (enzimă) sau prin fierbere îndelungată în apă.

La hidroliză, din fiecare mol de inulină rezultă 30 moli de D-fructofuranoză şi un mol de D-glucopiranoză. Resturile de fructoză sunt legate β-2,1-fructozidic, iar grupa OH fructozidică de la capătul reducător este esterificată cu un mol de α-D-glucopiranoză, printr-o legătură 1-glucozil-2-fructozidică :



R = rest de D-glucopiranoză

Inulina

Inulina nu este reabsorbită sau excretată de tubii renali şi de aceea se utilizează pentru măsurarea capacității de filtrare a rinichiului. Se mai foloseşte şi la măsurarea fluidului extracelular, pentru că traversează capilarele sanguine fără a fi preluată de celule. Pentru aceste determinări, inulina este injectată intravenos.

I.4.2.2. Poliglucide de rezervă din regnul animal

Glicogenul ("amidonul animal") este poliglucidul de rezervă din organismele animale. Structural, glicogenul se aseamănă cu amilopectina, dar spre deosebire de aceasta, este solubil în apă, fiind mai puțin ramificat. Glicogenul din ficat este un poliglucid format din aprox. 30.000 resturi de glucoză.

Lanțul principal al macromoleculei este alcătuit din resturi de D-glucoză, legate 1,4-α-glicozidic. Din loc în loc, pe catena principală sunt ramificații scurte (fig. I.2), separate între ele prin 8-12 resturi de glucoză (față de 24-30 resturi la amilopectină).

Deşi are masa moleculară de ordinul 10^6, glicogenul are un singur capăt reducător.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

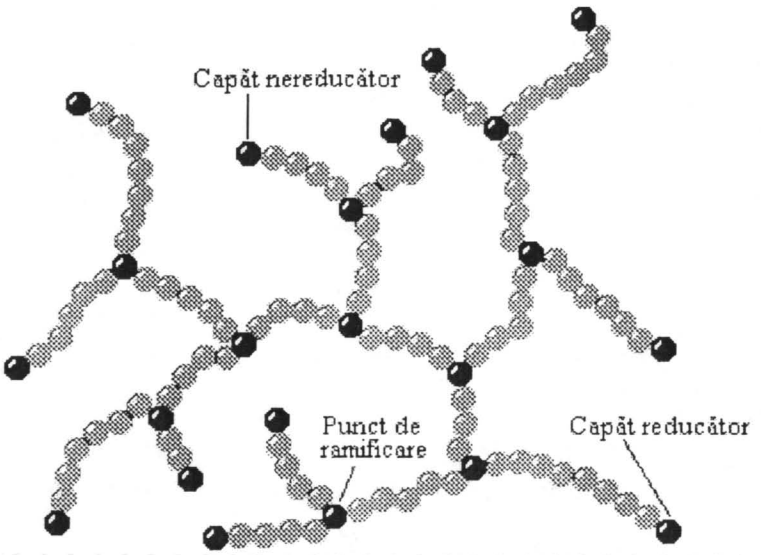


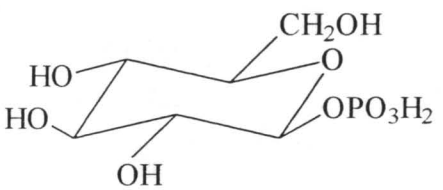
Fig. I.2 – Structura spațială a glicogenului

Ficatul şi mușchii animalelor sunt țesuturile în care se stochează glicogenul.

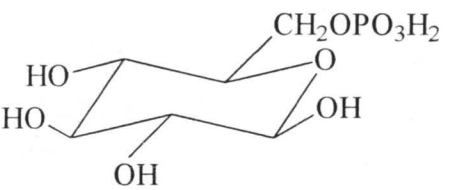
Biosinteza glicogenului (glicogenogeneza) are loc în ficat, din glucoză, cu participarea acidului adenozintrifosforic (ATP) şi a două enzime: glicogen sintetaza şi o enzimă de ramificare (amilo-1,4-1,6 transglicozidaza).

În mușchi este necesară prezența ATP pentru conversia glicogenului în glucozo-6-fosfat (G6P). Sub această formă poate fi metabolizat glicogenul, esterul G6P reprezentând şi punctul de plecare al glicolizei.

În procesul de utilizare a glicogenului stocat, esterii fosforici în 1 şi 6 ai glucozei sunt esențiali:



β-D-Glucozo-1-fosfat (G1P)
(Esterul lui Cori)



β-D-Glucozo-6-fosfat (G6P)
(Esterul lui Robinson)

Glicogenul este degradat prin scindarea enzimatică a lanțului poliglucidic sub influența glicogenfosforilazei, rezultând G1P şi un lanț hidrocarbonat conținând o unitate de glucoză mai puțin:

$$\underset{\text{(n resturi)}}{\text{Glicogen}} + P_i \rightleftharpoons \underset{\text{(n-i resturi)}}{\text{Glicogen}} + \text{G1P}$$

Ulterior, sub influența unei izomeraze specifice, esterul G1P este convertit la fosfatul G6P, care constituie punctul de plecare pentru diverse transformări metabolice.

În ficat, concentrația redusă de glucoză din sânge împiedică ruperea glicogenului la G6P, care în acest caz este hidrolizat la glucoza eliberată în circulația sângelui, necesară pentru procesul invers, de sinteză a glicogenului (glicogenogeneza) :

$$\text{Glucoză} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{G6P} \rightleftharpoons \text{G1P} \rightleftharpoons \text{Glicogen}$$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Efortul metabolic crescut al organismului în utilizarea glicogenului ca sursă de energie în comparație cu cel de la utilizarea grăsimilor în același scop, se explică prin următoarele:

- mușchii mobilizează mai rapid grăsimile decât glicogenul;
- resturile de acizi grași din grăsimi pot fi metabolizate anaerobic;
- animalele pot converti acizii grași la precursori de glucoză, astfel încât să se poată menține un nivel corespunzător al glucozei în sânge.

I.5. Transformările biochimice ale glucidelor

I.5.1. Fotosinteza

Fotosinteza, denumită și asimilație clorofiliană, reprezintă procesul prin care vegetalele clorofiliene elaborează glucide utilizând ca materii prime dioxidul de carbon din apă sau din aer, sub acțiunea energiei luminoase captată de clorofilă:

$$6CO_2 + H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

La plantele superioare și algele verzi, ca și la cianobacterii, donorul de oxigen este apa. În cazul altor bacterii fotosintetice, donorii de electroni sunt alte substanțe simple (ca H_2S); biosinteza fiind un proces mai simplu, în urma căruia nu se formează oxigen.

Reacțiile fotochimice care au loc în cursul fotosintezei se produc la nivelul cloroplastelor, organite celulare considerate adevărați poli energetici ai celulei vegetale (fig. I.3).

Privite la microscopul optic, cloroplastele apar în celulele mușchilor sau *elodea* ("ciuma apelor") ca niște discuri verzi deplasate de curenții citoplasmatici. La microscopul electronic se observă că aceste organite au membrană dublă – internă și externă – care închid conținutul cloroplastelor (stroma).

În cloroplast sunt conținute sub formă compactă numeroase structuri în formă de disc, care includ clorofilă și lipide, în interiorul membranei duble de proteine (fig. I.3). Se pare că această dispoziție foarte compactă și înalt ordonată este absolut necesară pentru funcția clorofiliană, din necesitatea ca moleculele să fie cât mai apropiate între ele, pentru ca transferurile energetice să poată avea loc.

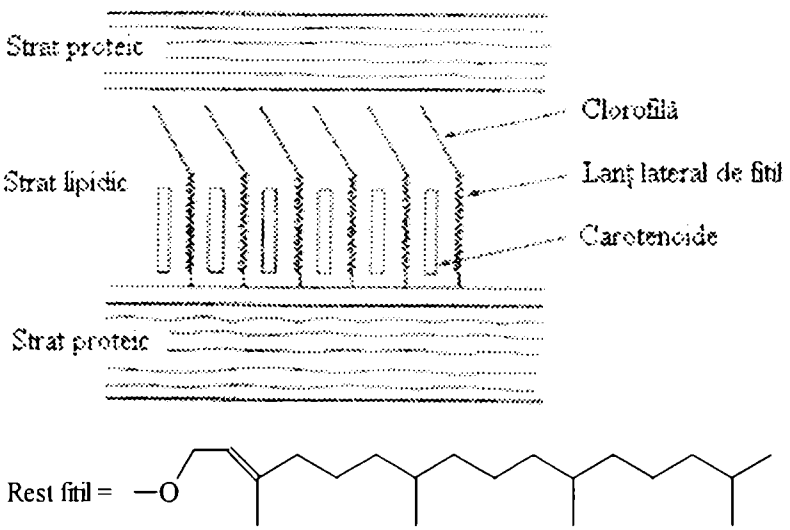


Fig. I.3 – Dispoziția clorofilei în interiorul cloroplastei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Alți compuși liposolubili colorați, cu mare putere de absorbție a luminii, carotenoidele (colorate în galben, portocaliu, roșu) sunt prezenți în egală măsură și joacă rolul de fotoabsorbanți secundari, care transferă pe moleculele de clorofilă energia luminoasă absorbită.

Este deci evident că dacă moleculele de clorofilă ar fi singura specie prezentă capabilă de a absorbi lumina, fotosinteza nu s-ar produce decât plecând de la regiunea spectrală în care clorofila **a** absoarbe puternic (λ = 560-700 nm). În cursul fotosintezei, energia absorbită în totalitate de molecule de clorofilă este transferată de pe aceste molecule pe un sit reacțional. Mecansimul exact al acestor transferuri energetice care declanșează seria de reacții din fotosinteză nu a fost încă total elucidat.

Fotosinteza cuprinde de fapt două procese separate: reacții care au loc în prezența luminii și cele care au loc la întuneric ("fază obscură").

- În prima fază are loc o fotoliză, cu degradarea moleculelor de apă sub influența luminii:

O moleculă (care joacă rol de donor de electroni) este excitată, cedează electroni și se transformă în forma oxidată. Ea declanșează apoi o serie de reacții de transfer de electroni care duc în ultimă instanță la captarea electronilor de către ionii OH^- din apă. Acești ioni sunt oxidați la oxigen, iar molecula care le primește este redusă:

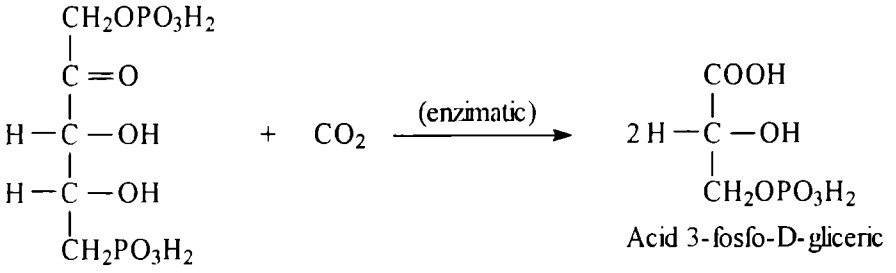
$$H_2O + \underset{\text{(Codehidraza I)}}{NADP^+} \longrightarrow \underset{\text{(Hidrocodehidraza I)}}{NADPH} + 1/2O_2 + H^+$$

Acest ciclu de oxidoreducere este cuplat cu reacția dintre un fosfat anorganic și adenosindifosfat (ADP), care este transformat în adenosin-trifosfat (ATP), bogat în energie.

Procesul de transformare al ADP în ATP se numește fotofosforilare. Electronii eliberați sunt reintroduși, grație unei clorofile excitate, într-o altă secvență de oxidoreducere, conducând la transformarea $NADP^+$ în NADPH, forma sa redusă.

- În "faza obscură", dioxidul de carbon atmosferic absorbit de frunze suferă o reducere sub acțiunea ionilor de hidrogen (H^+), apoi este integrat intr-un ciclu biochimic care conduce la sinteza de glucide, numit "ciclul lui Calvin". La "etapa obscură" participă NADPH și ATP formați în faza precedentă. Mecanismul transformării CO_2 a fost dovedit lucrându-se cu CO_2 marcat radioactiv.

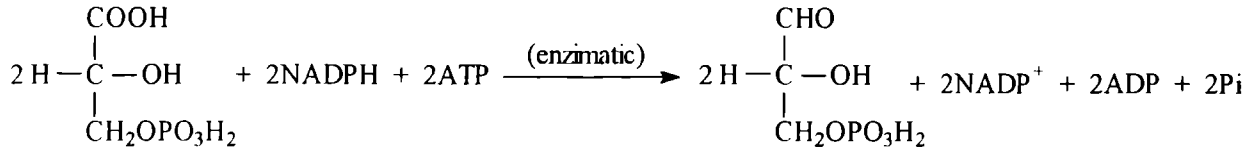
Dioxidul de carbon reacționează sub influența unei enzime asupra derivatului difosfatat al unei pentoze, producând astfel două molecule de acid 3-fosfo-D-gliceric. Urmează reducerea enzimatică a acidului 3-fosfo-D-gliceric la 3-fosfo-D-gliceraldehidă, sub influența NADPH și ATP formați în prima etapă, $NADP^+$ rezultat reintrând în această etapă. Se pare că principalul substrat este, în "etapa obscură", 1,5-difosfatul D-ribulozei:



1,5-Difosfat al D-ribulozei

Acid 3-fosfo-D-gliceric

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



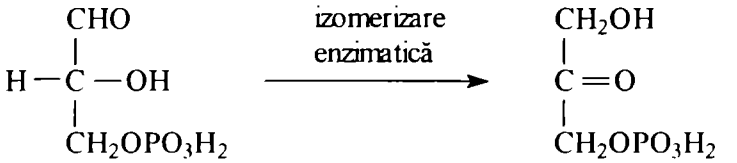
3-Fosfo-D-gliceraldehidă

Cele două molecule de 3-fosfo-D-gliceraldehidă sunt apoi introduse într-un ciclu care conduce în final la glucoză; în timp ce ATP este transformat în ADP.

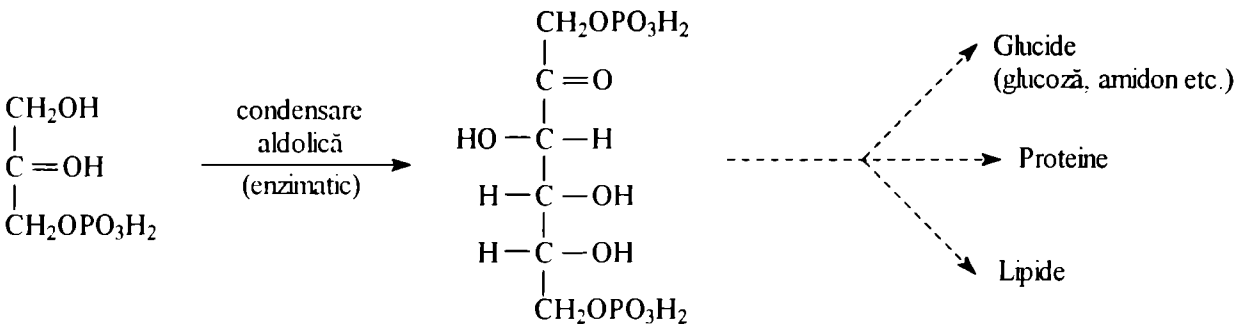
O parte din cantitatea de 3-fosfat al D-gliceraldehidei format este apoi epimerizată enzimatic la 3-fosfatul dihidroxiacetonei.

Între cei doi fosfați (ai gliceraldehidei şi dihidroxiacetonei) se produce o reacție enzimatică de aldolizare, în urma căreia rezultă 1,6-D-fructozo-difosfat, care se transformă printr-un şi de decondensări şi condensări catalizate în difosfat de ribuloză, care fixează iar o moleculă de CO_2, reluându-se ciclul de reacții din "faza obscură".

O parte din difosfatul fructozei este transformată apoi în hexoze (mai ales glucoza) şi alte glucide (produsul principal al fotosintezei fiind amidonul), proteine şi grăsimi.



3-Fosfo-D-gliceraldehidă — 3-Fosfo-dihidroxiacetonă



1,6-Difosfatul D-fructozei

Energia necesară pentru formarea unui mol de glucoză, componenta de bază a amidonului, este de +686 kcal.

Mecanismul complex al fotosintezei a fost elucidat în mare parte de către M. Calvin în perioada 1947 – 1957, prin folosirea atomilor de carbon marcați izotopic şi implică drept intermediari glucide cu 3, 5, 7 şi 9 atomi, în afară de cele cu 6 atomi.

O plantă alimentată cu $^{14}CO_2$ a fost supusă iradierii pe perioade variabile de timp. S-a observat astfel că după câteva secunde de activitate fotosintetică, atomul ^{14}C n-a fost incorporat decât în doi sau trei compuşi simpli. Crescând gradual perioada de iradiere, ^{14}C se regăseşte într-un număr crescător-progresiv de compuşi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

I.5.2. Fermentația alcoolică

Fermentația alcoolică este un proces biochimic anaerob, prin care glucoza este transformată în etanol și dioxid de carbon:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

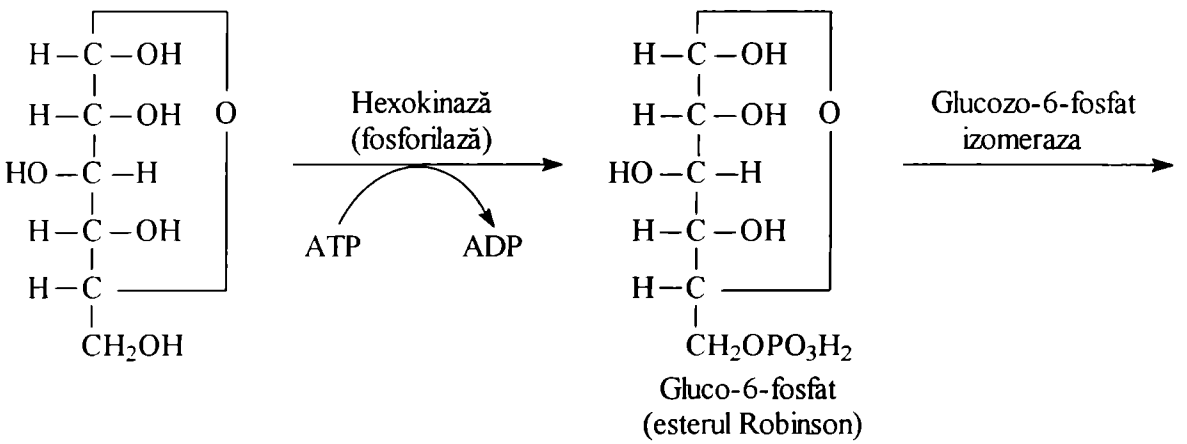
Procesul este multisecvențial, incluzând mai multe secvențe (etape) reacționale, fiecăreia dintre ele corespunzându-i enzima și cofactorul respectiv.

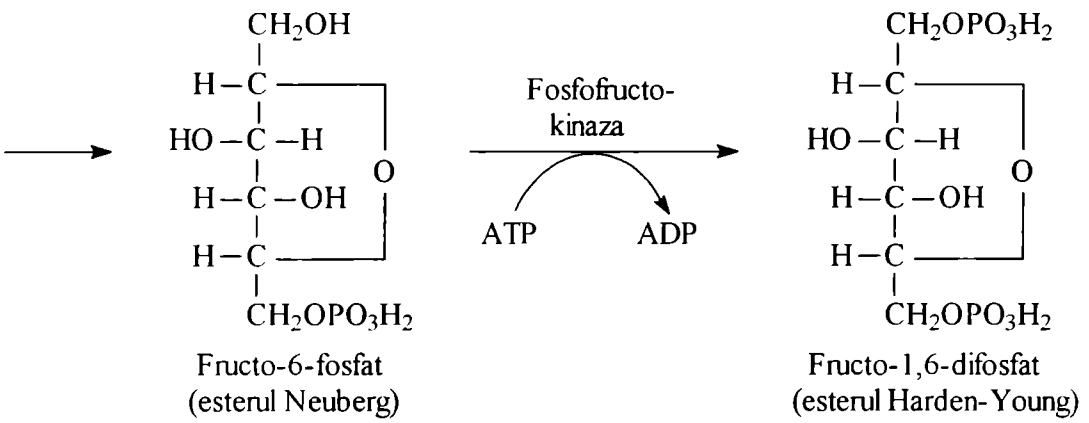
Complexul enzimatic care catalizează fermentația este conținut în celulele de drojdie de brutărie (*Saccharomyces cerevisiae*).

Etapele principale ale fermentației alcoolice sunt următoarele:

1° Fosforilarea

Rezultatul final al acestei etape este 1,6-difosfatul D-fructofuranozei (esterul Harden – Young), format în urma unor transformări enzimatice succesive ale D-glucopiranozei, fiecare secvență fiind catalizată de o enzimă specifică. Agentul de fosforilare este adenosintrifosfatul (ATP):



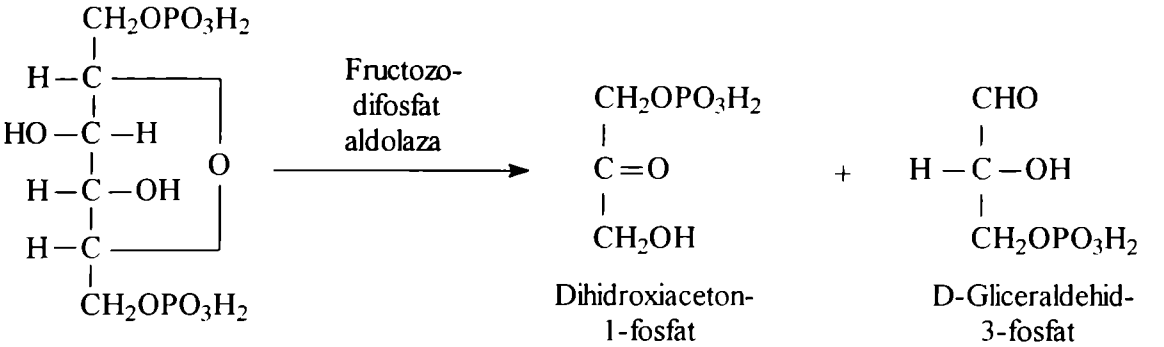


Esterul Harden-Young reprezintă punctul de plecare propriu-zis al fermentației alcoolice.

2° Scindarea

În această etapă are loc o decondensare aldolică, în care fructo-1,6-difosfatul este scindat sub influența unei aldolaze.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

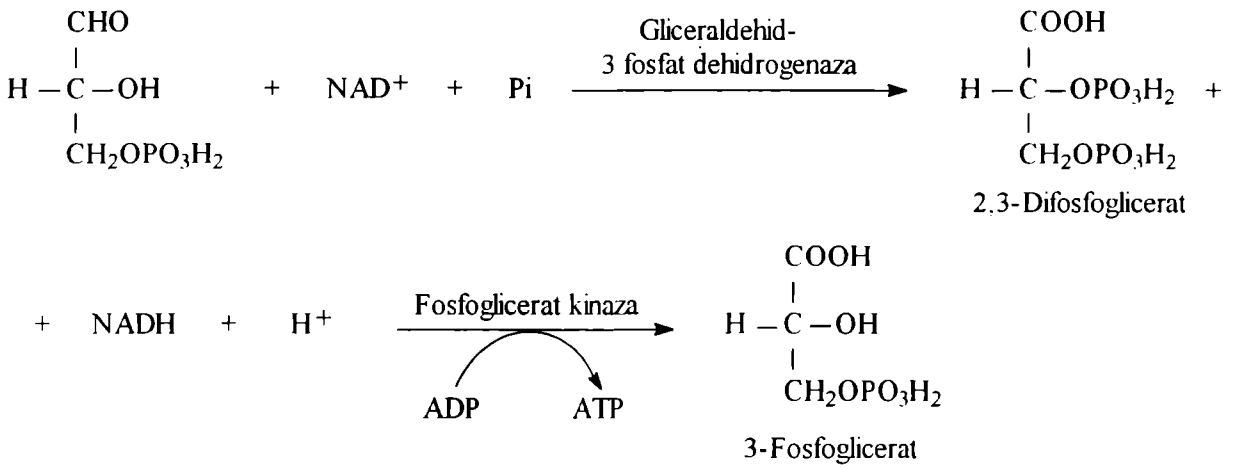


La echilibru, dihidroxiaceton-1-fosfatul este transformat în D-gliceraldehid-3-fosfat, sub influența unei enzime (izomeraza fosfaților de trioze).

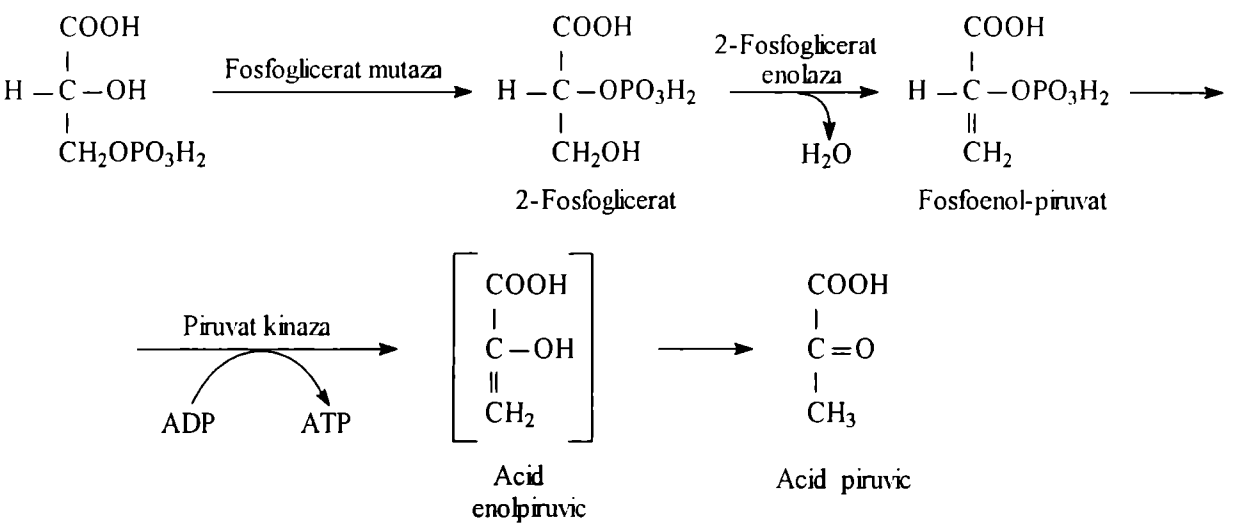
La transformările ulterioare din procesul de formare a etanolului participă numai D-gliceraldehid-3-fosfatul. Pe măsură ce acesta se consumă, echilibrul se deplasează în sensul izomerizării dihidroxiaceton-1-fosfatului la D-gliceraldehid-3-fosfat.

3° Oxidarea

În această etapă, D-gliceraldehid-3-fosfatul este oxidat (în două trepte), până la 3-fosfoglicerat, cu participarea nicotinamiddinucleotidei, forma oxidată (NAD^+) şi a adenosindifosfatului (ADP):



4° Formarea acidului piruvic

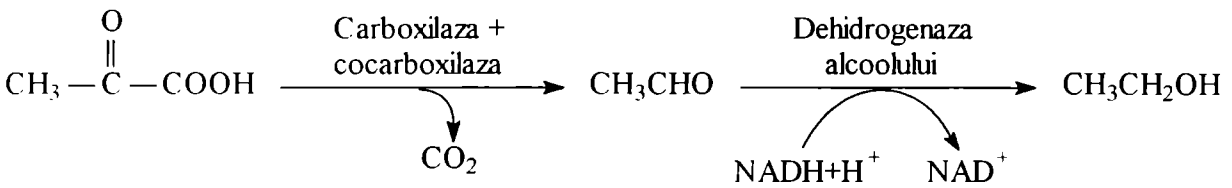


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Făcând bilanțul energetic al conversiei glucozei la acid piruvic în raport cu resturile de fosfat bogate în energie care se consumă sau se formează, rezultă un consum total de 2 moli de ADP și formarea a 4 moli de ATP (inclusiv transformarea fosfatului dihidroxiacetonei la fosfatul glicerinaldehidei).

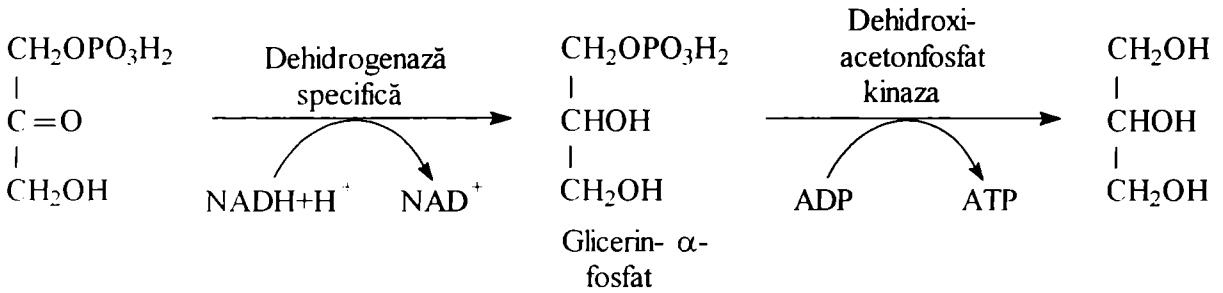
5° Formarea etanolului

Această etapă are loc sub influența carboxilazei (enzimă din drojdia de bere), a cocarboxilazei (difosfat al vitaminei B_1) și a dehidrogenazei alcoolului, cu participarea NADH:



În fermentația alcoolică, pe lângă produsul principal (etanolul) se formează ca produși secundari acetaldehida și glicerina.

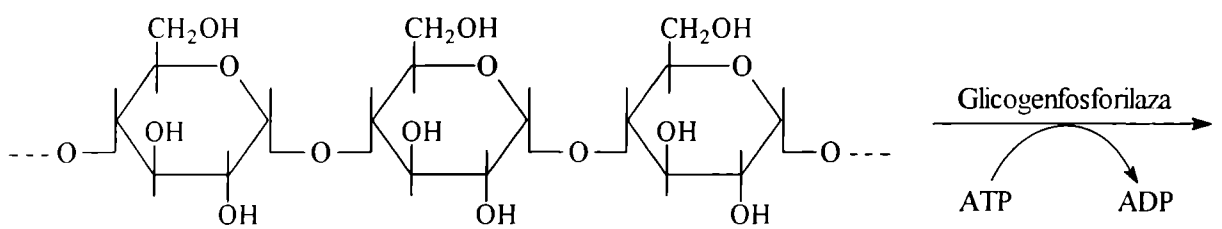
Reacția secundară de formare a glicerinei este competitivă cu etapa 5° și are loc la începutul fermentației, când concentrația de aldehidă acetică este scăzută, neputând folosi toată cantitatea de NADH din mediu. În acest caz, o parte din coenzimă va participa la reducerea dihidroxiaceton-1-fosfatului:



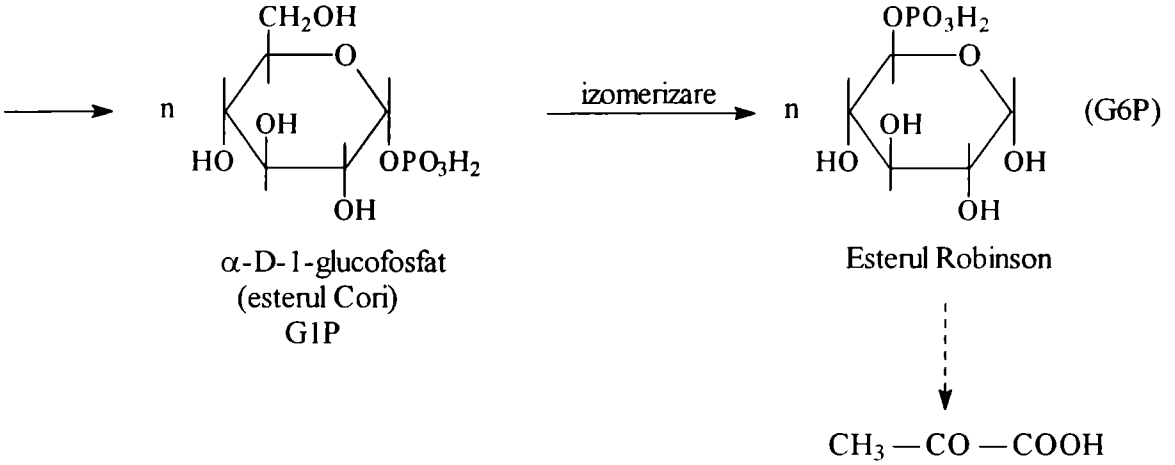
I.5.3. Glicoliza

Acest proces reprezintă calea metabolică extramitocondrială, în care glucidele sunt scindate de acidul adenosintrifosforic (ATP).

În țesuturile animale, care conțin glicogen ca principala formă de stocare a glucozei, are loc un proces asemănător cu fermentația alcoolică, până la etapa de formare a acidului piruvic. Lanțurile principale ale moleculei de glicogen formate din resturi de D-glucopiranoză legate 1,4-α-glicozidic sunt scindate și se transformă în acid piruvic:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



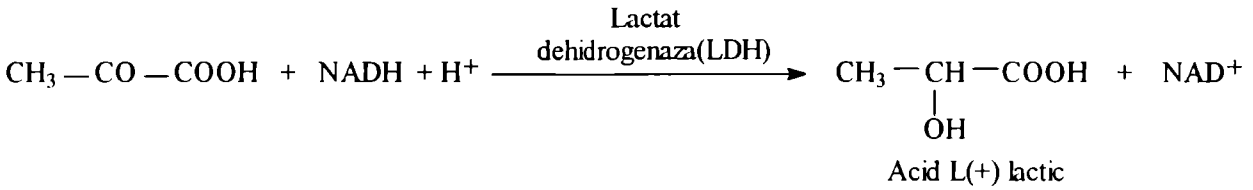
Acidul piruvic astfel format suferă două feluri de transformări:

- glicoliza anaerobică reprezintă calea metabolică în care acidul piruvic este degradat anaerob. Per ansamblu, se produc două molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză metabolizată;

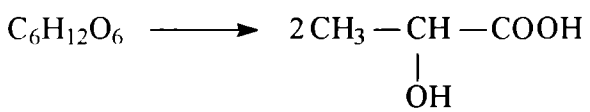
- glicoliza aerobă sau ciclul Krebs al acidului citric, care intervine în respirație. Per ansamblu, se produc 8 molecule de ATP.

1° Glicoliza anaerobică

În țesuturile animale insuficient aerate, care nu conțin sistemul enzimatic multisecvențial al decarboxilării acidului piruvic, acesta se transformă în acid L(+) lactic, sub influența NADH:



Ecuația de bilanț a glicolizei anaerobice va fi:



Acidul lactic se formează în cantități mici, un timp scurt, în țesutul muscular și este transportat prin circulația sanguină la ficat, unde se transformă în glicogen printr-un proces invers glicolizei, cu consum de ATP.

Dacă mușchii sunt supuși unui efort prelungit, pentru care aportul de oxigen prin circulația sângelui este insuficient, acidul lactic se acumulează în cantități excesive, provocând crampe musculare.

2° Glicoliza aerobică

Acest proces (principala cale de transformare biochimica a acidului piruvic în organismul animal) este cunoscut și sub numale de ciclu al acizilor tricarboxilici (TCA) sau ciclul Krebs al acidului citric.

În această transformare, o parte a acidului piruvic este oxidată la dioxid de carbon (CO_2 eliminat prin respirație), furnizând energie. Restul de acid piruvic este transformat în intermediari pentru biosinteza acizilor carboxilici din lipide ca și a aminoacizilor neesențiali din proteine (fig. I.4).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

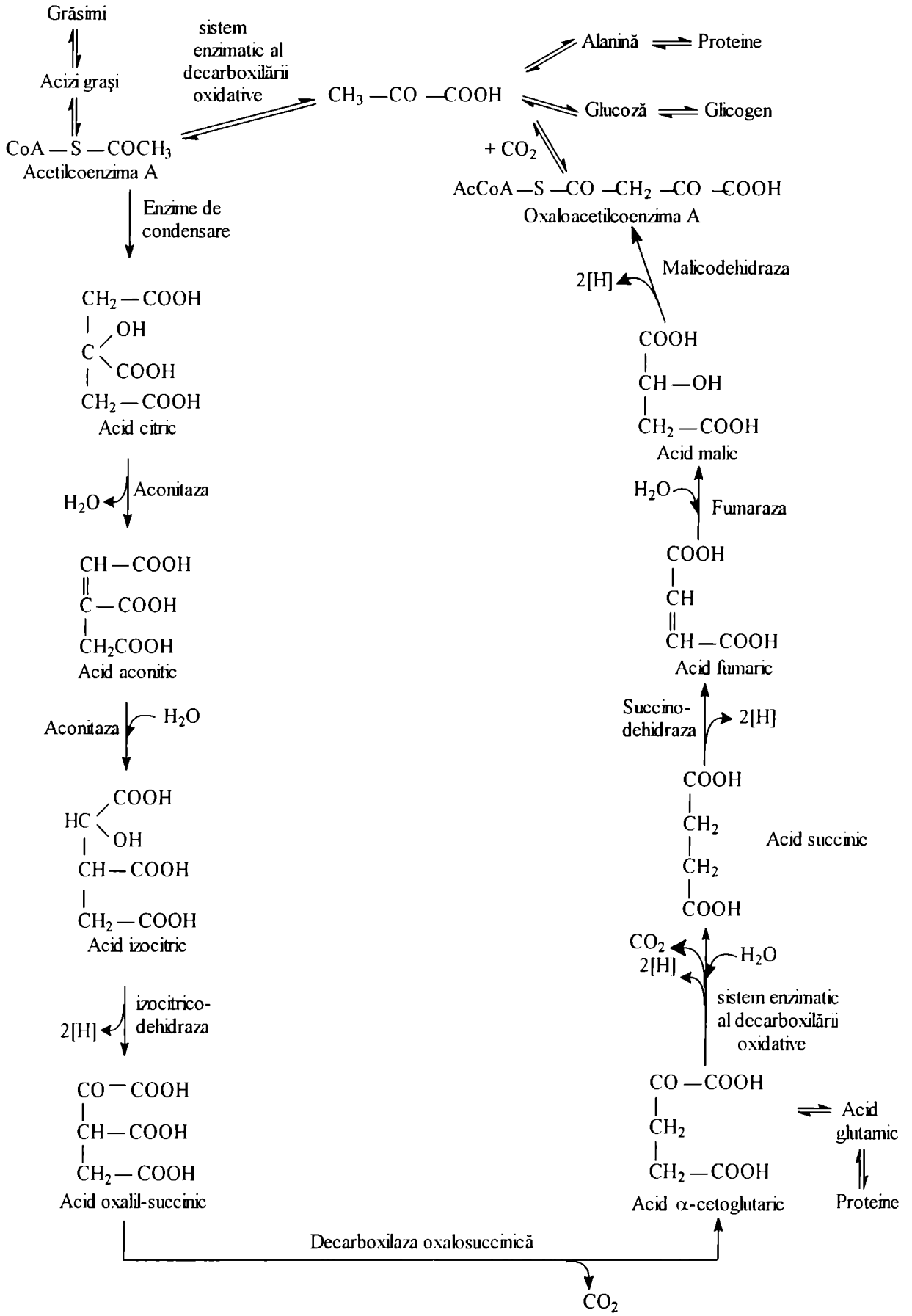


Fig. I.4 Ciclul Krebs al acidului citric (sau ATC = ciclul acizilor tricarboxilici)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În prima etapă, acidul piruvic suferă o decarboxilare oxidativă, sub influența unei enzime specifice (oxidaza piruvică) și a cocarboxilazei (piro-fosfatul tiaminei).

Ecuația de bilanț a procesului este:

$$CH_3-CO-COOH + NAD^+ + H_3PO_4 + ADP \longrightarrow CH_3COOH + NADH + H^+ + ATP$$

Reacția are loc în prezența coenzimei A (acceptor de grupe acil), astfel încât acidul acetic care participă la transformarea globală intervine sub formă de acetil-coenzimă A ($CoA\text{-}S\text{-}COCH_3$).

Ecuația de bilanț a transformării globale din ciclul Krebs va fi:

$$CH_3-COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H$$

În fig. I.4 este schematizat acest ciclu; esențială este deci calea prin care cei doi atomi de carbon din acidul acetic sunt oxidați la CO_2 și apă, cu producerea de energie biologică.

În glicoliză, ca și în fermentația alcoolică, conversia glucozei la acid piruvic este reglată pe cale hormonală de către insulină, glucagon (hormon plipeptidic sintetizat în insulele pancreatice și la alte mamifere decât om – în mucoasa gastrică) și adrenalină. Fosfofructokinaza este principala enzimă reglatoare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.1. Aminoacizi

II.1.1. Generalități

Cei 20 de α-aminoacizi naturali, constituenți ai proteinelor, sunt de fapt unitățile structurale ale acestei clase de biomolecule. Aceştia sunt "aminoacizii standard", strămoşii primordiali ai proteinelor conținute de organismele vii.

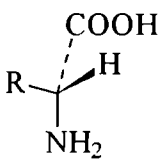
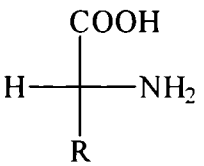
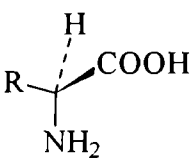
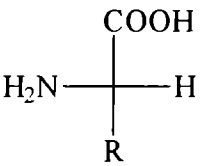
Ca rezultat al evoluției şi diversificării celulare, s-au format de-a lungul timpului biomolecule complexe şi specializate; deşi se cunosc peste 200 aminoacizi izolați din materia vie, toți derivă practic din cei 20 aminoacizi "standard", primordiali.

Dintre aminoacizii naturali, un număr de 8 α-aminoacizi, numiți esențiali, sunt indispensabili organismului uman care nu-i poate sintetiza (decât eventual în cantități insuficiente), sursa principală a acestora fiind de natură exogenă (proteinele ingerate prin alimentație). Restul de 12 α-aminoacizi standard sunt "neesențiali", organismul având resurse pentru biosinteza lor.

In afară de glicocol (glicină), toți ceilalți α-aminoacizi "standard" au un atom de carbon asimetric în α, prezentând două structuri stereochimice (tabel nr. II.1).

Tabel nr. II.1

Familiile (seriile) sterice ale α-aminoacizilor optic activi

Familia sterică	Formula stereochimică simplificată	Formula de proiecție plană (Fischer)	Configurația atomului de C_α
D			R
L			S

Proteinele naturale sunt alcătuite exclusiv din L-α-aminoacizi; doar din surse microbiologice s-au separat şi D-α-aminoacizi.

II.1.2. Nomenclatură, clasificare

Există mai multe criterii de clasificare a α-aminoacizilor:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

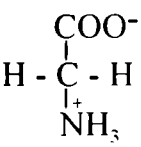
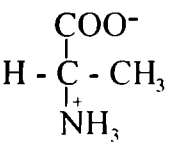
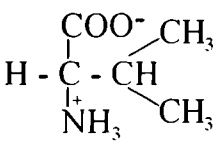
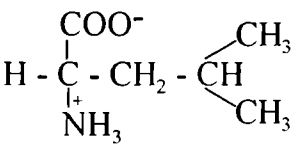
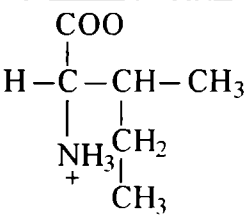
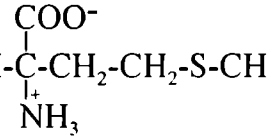
- după numărul de grupe $-NH_2$ şi $-COOH$ din moleculă (mono- şi dicarboxilici, mono- şi diaminoacizi etc.);
- după natura R a restului hidrocarbonat (alifatici, aromatici, heterociclici);
- după natura altor grupe fixate pe radicalul R (hidroxiaminoacizi, tioaminoacizi etc.);
- după polaritatea radicalului R (polari şi nepolari);
- după rolul biologic (esenţiali şi neesenţiali).

II.1.2.1. Aminoacizii naturali "standard"

În tabelul nr. II.2 sunt reprezentate formulele structurale ale celor 20 de aminoacizi "standard", împreună cu simbolurile lor prescurtate, folosite în biochimie.

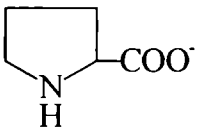
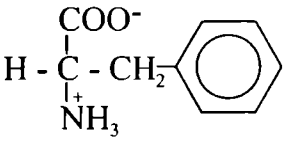
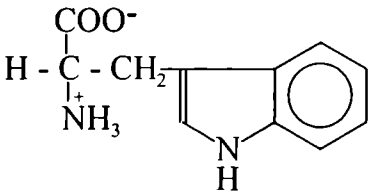
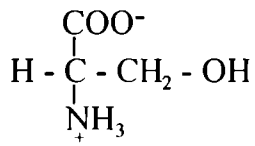
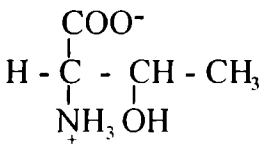
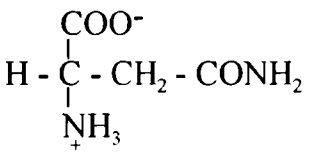
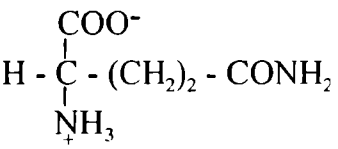
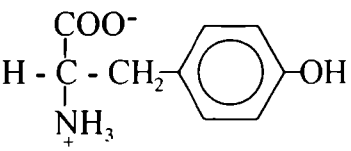
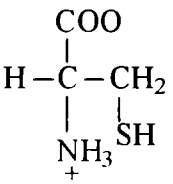
Tabel nr. II.2

Aminoacizii naturali "standard"

Nr. crt.	Numele	Formula structurală (forma ionizată)*	Simbol	Conţinutul mediu în proteine (%)	Punct izoelectric
0	1	2	3	4	5
I	Aminoacizi cu catene nepolare				
1	Glicină (glicocol) (acid aminoacetic)		Gly	7,5	5,97
2	L-Alanină (acid α-aminopropionic)		Ala	9,0	6,02
3**	L-Valina (acid α-amino-izovalerianic)		Val	6,9	5,97
4**	L-Leucina (acid α-aminoizocapronic)		Leu	7,5	5,98
5**	L-Izoleucina (acid α-amino-β-metilvalerianic)		Ile	4,6	6,02
6**	L-Metionina (acid 2-amino-4-metil-mercaptobutiric)		Met	1,7	5,75

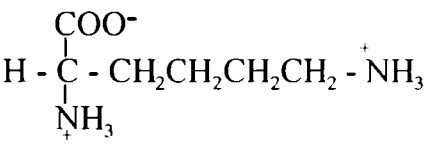
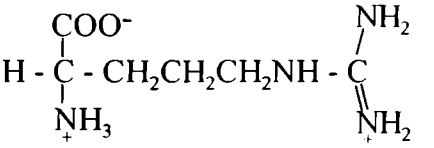
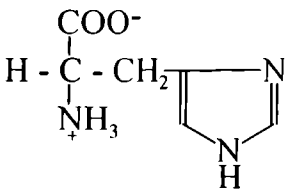
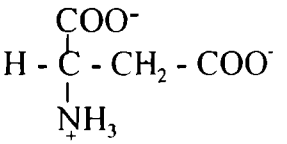
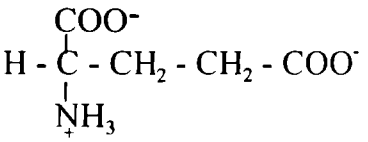
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. II.2 (continuare)

0	1	2	3	4	5
7	L-Prolina (acid pirolidin-α-carboxilic)		Pro	4,6	6,10
8**	L-Fenilalanina (acid α-amino-β-fenilpropionic)		Phe	3,5	5,98
9**	L-Triptofan (acid α-amino-β-indolilpropionic)		Trp	1,1	5,98
II	Aminoacizi cu catene polare fără sarcini electrice				
10	L-Serina (acid α-amino-β-hidroxipropionic)		Ser	7,1	5,68
11**	L-Treonina (acid α-amino-β-hidroxibutiric)		Thr	6,0	6,53
12	L-Asparagina (amida acidului aspartic)		Asn	4,4	5,41
13	L-Glutamina (amida acidului glutamic)		Gln	3,9	5,61
14	L-Tirozina [acid α-amino-β-(p-hidroxifenil)-propionic]		Tyr	3,5	5,65
15	L-Cisteina (acid α-amino-β-mercaptopropionic)		Cys	2,8	5,02

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. II.2 (continuare)

0	1	2	3	4	5
III	Aminoacizi cu catene polare cu sarcini electrice				
16**	L-Lisina (acid α,ε-diamino-caproic)		Lys	7,0	9,74
17	L-Arginina (acid α-amino-δ-guanidinvalerianic		Arg	4,7	10,76
18	L-Histidina (acid α-amino-β-imidazolil-propionic)		His	2,1	5,78
19	Acid L-aspartic (acid α-amino-succinic)		Asp	5,5	2,97
20	Acid L-glutamic (acid α-amino-glutaric)		Glu	6,2	3,22

* La pH =7,0 predomină formele ionizate

** Aminoacizi esențiali

II.1.2.2. Aminoacizi "nestandardizați" din unele proteine

Aceşti α-aminoacizi, componenți ai unor proteine vegetale şi animale, au rezultat prin modificarea resturilor de aminoacizi "standard", după biosinteza lanțului polipeptidic al proteinelor specifice (tabel nr. II.3).

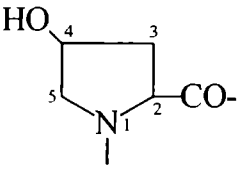
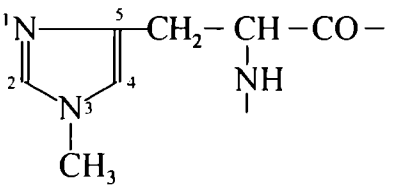
Un exemplu este cazul aminoacizilor constituenți ai proteinelor ribozomiale şi cromozomiale, care pot suferi metilări, acetilări, fosforilări specifice.

N-formilmetionina este capătul N-terminal al tuturor proteinelor procariotice, dar este îndepărtată frecvent în cursul maturizării proteinei. Acidul N-carboxiglutamic este constituent al unor proteine implicate în coagularea sângelui; ε-N-trimetillisina şi N-metilhistidina apar ca derivați ai aminoacizilor prezenți în unele proteine musculare etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

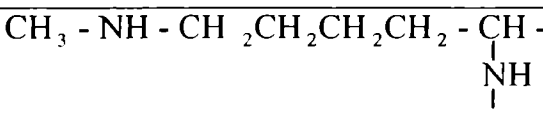
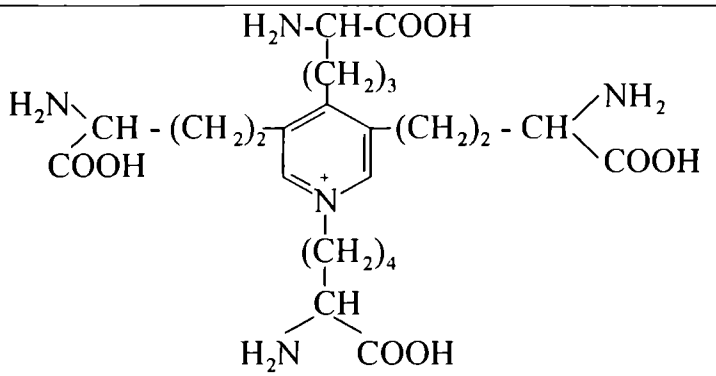
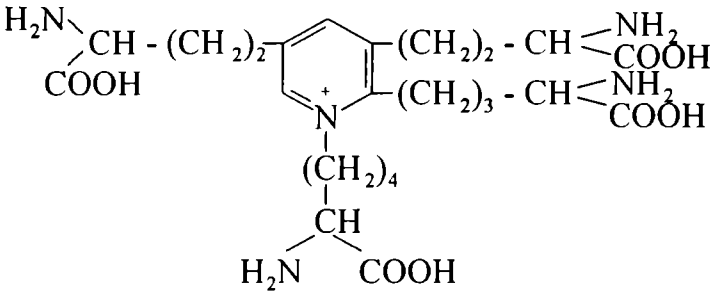
Tabel nr. II.3

Exemple de aminoacizi "nestandardizați" prezenți în proteine naturale

Nr. crt.	Denumirea restului de aminoacid	Structură
0	1	2
1	4-Hidroxiprolina (Hyp)	
2	5-Hidroxilisina (Hyp)	$H_3\overset{+}{N}\text{-}CH_2\text{-}\underset{OH}{CH}\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underset{NH}{CH}\text{-}CO\text{-}$
3	N-Formilmetionina	$CH_3\text{-}S\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underset{\substack{NH\\ CHO}}{CH}\text{-}CO\text{-}$
4	γ-carboxiglutamat	$\begin{matrix}COO^-\\ \diagdown\\ CH\text{-}CH_2\text{-}\underset{NH}{CH}\text{-}CO\text{-}\\ \diagup\\ COO^-\end{matrix}$
5	N, N, N-Trimetil-lisina	$(CH_3)_3\overset{+}{N}\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underset{NH}{CH}\text{-}CO\text{-}$
6	3-Metil-histidina	
7	O-Fosfoserina	$^{2-}O_3P\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}\underset{NH}{CH}\text{-}CO\text{-}$
8	ε-N-Acetil-lisină	$CH_3\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underset{NH}{CH}\text{-}CO\text{-}$
9	ω-N-Metil-arginină	$CH_3\text{-}\underset{H}{\overset{+}{N}}=\overset{NH_2}{\overset{\|}{C}}\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}\underset{NH}{CH}\text{-}CO\text{-}$
10	N-Acetil-serina	$CH_3\text{-}\overset{O}{\overset{\|}{C}}\text{-}NH\text{-}\underset{}{CH}(CH_2\text{-}OH)\text{-}CO\text{-}$
11	N,N,N-Trimetil-alanina	$(CH_3)_3\overset{+}{N}\text{-}\underset{CH_3}{CH}\text{-}CO\text{-}$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. II.3 (continuare)

0	1	2
12	ε-N-Metil-lisina	
13	Desmozina	
14	Izodesmozina	

II.1.2.3. Aminoacizi "nestandardizați" neconstituenți ai proteinelor

În organismele vii se găsesc şi o serie de aminoacizi "nestandardizați", fie în stare liberă, fie ca părți constituente ale unor compuşi naturali neproteici.

Spre deosebire de α-aminoacizii din proteine, care aparțin seriei sterice L, aceştia pot fi: α-L-, α-D-, β- sau γ-aminoacizi. Rolul lor biologic este foarte diversificat şi, în unele cazuri, încă neelucidat (Tabel nr. II.4).

Astfel, β-alanina apare ca o componentă a acidului pantotenic, a coenzimei A, a carnozinei şi a anserinei.

Glicina, acidul γ-aminobutiric (GABA) şi dopamina joacă rol de mesageri chimici intercelulari. Histamina rezultată prin decarboxilarea histidinei este mediator local al reacțiilor alergice, iar tiroxina (derivat iodurat al tirosinei) este hormon tiroidian, cu rol stimulator în metabolismul vertebratelor.

Alți aminoacizi se formează ca intermediari metabolici (citrulina şi ornitina – în biosinteza ureei, homocisteina – în metabolismul aminoacizilor etc.).

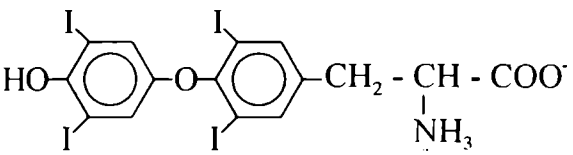
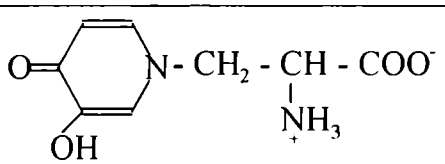
În surse microbiologice sunt prezenți D-aminoacizi, sintetizați direct sau (în majoritatea cazurilor) fiind constituenți ai membranelor celulare ale viruşilor şi bacteriilor.

Unii dintre aceştia determină fragilizarea membranelor microbiene la atacul peptidazelor, ceea ce explică digestia acestor membrane de către unele organisme.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

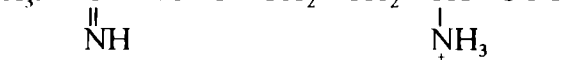
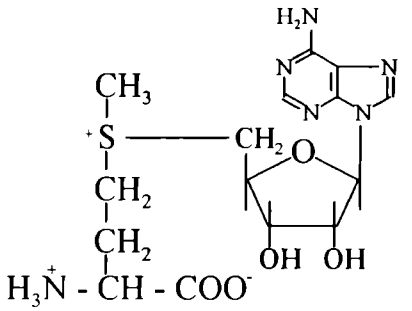
Tabel nr. II.4

Exemple de aminoacizi naturali "nestandardizați", neconstituenți ai proteinelor

Nr. crt.	Denumire	Structură
0	1	2
1	β-Alanina	$H_3\overset{+}{N} - CH_2 - CH_2 - COO^-$
2	Acid γ-aminobutiric (GABA)	$H_3\overset{+}{N} - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO^-$
3	Homocisteină	$HS - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
4	Homoserină	$HO - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
5	Citrulina	$H_2N - \overset{\overset{O}{\Vert}}{C} - NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
6	Ornitina	$H_3\overset{+}{N} - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
7	Tiroxina	
8	β-Cianoalanina	$NC - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
9	Azaserina	$^-N = \overset{+}{N} = CH - \overset{\overset{O}{\Vert}}{C} - O - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
10	Acid djencolic	$^-OOC - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - CH_2 - S - CH_2 - S - CH_2 - \underset{\overset{\vert}{\overset{+}{N}H_3}}{CH} - COO^-$
11	Mimosina	

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. II.4 (continuare)

0	1	2
12	Canavanina	
13	S-Adenosilmetionina	

II.1.3. Metode de obținere

Obținerea α-aminoacizilor naturali trebuie să raspundă multiplelor utilizări ale acestora, pentru: studii biochimice, sinteza unor peptide şi proteine biologic active, utilizarea aminoacizilor în industria farmaceutică, în industria alimentară, în terapia medicală, în sinteza organică fină etc.

Există mai multe căi utilizate pentru obținerea α-aminoacizilor:

- sinteza chimică organică, în urma căreia aminoacizii optic activi rezultă sub forme racemice, deoarece condițiile de operare (în laborator sau în industrie) sunt achirale.

Cum doar L-α-aminoacizii prezintă importanță în calitatea lor de unități constituente ale biomoleculelor de proteine, sinteza organică trebuie urmată de scindarea amestecurilor racemice obținute.

Aplicând diverse metode (fizice, chimice, biochimice) de scindare a racemicilor se obțin enantiomeri L optic puri ai α-aminoacizilor naturali.

Sinteza chimică organică a rămas până în prezent principala cale de obținere a unor cantități mari de α-aminoacizi naturali;

- sinteza asimerică totală pe cale biochimică, utilizând înalta specificitate de substrat şi de reacție a enzimelor. Se obțin L-α-aminoacizi de puritate optică 100%;

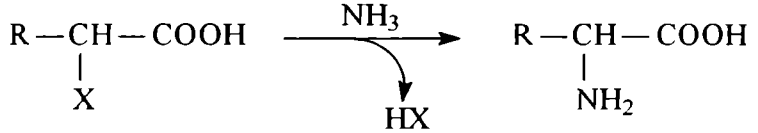
- hidroliza enzimatică a proteinelor a fost de fapt prima metodă utilizată pentru obținerea α-aminoacizilor naturali.

II.1.3.1. Metode de sinteze chimice organice

Pentru a răspunde cererii tot mai mari de α-aminoacizi naturali, s-a dezvoltat un mare număr de metode de sinteză; dintre acestea, unele au o aplicabilitate generală sau mai restrânsă, iar altele sunt caracteristice doar unor termeni individuali ai clasei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

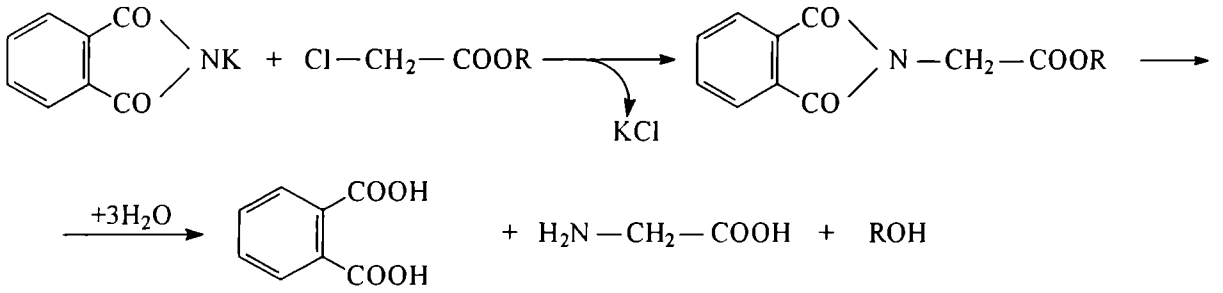
A. Aminarea acizilor α-halogenați se face cu un exces de amoniac, pentru a se evita formarea aminelor secundare:



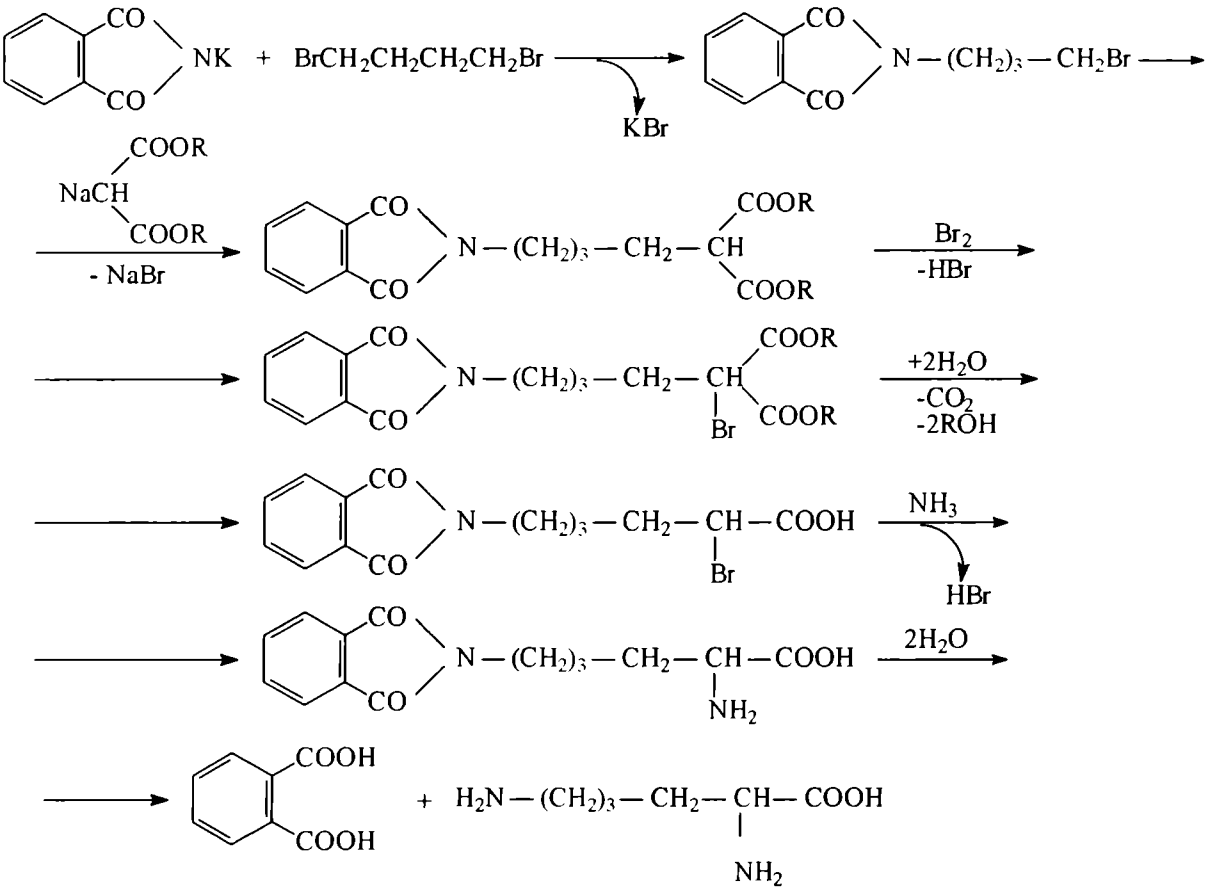
X = Cl, Br

Prin această metodă se obțin în special glicocolul (R = H) și alanina ($R = CH_3$).

B. Metoda Gabriel de alchilare a ftalimidei potasice cu esterul unui acid α-halogenat primar:

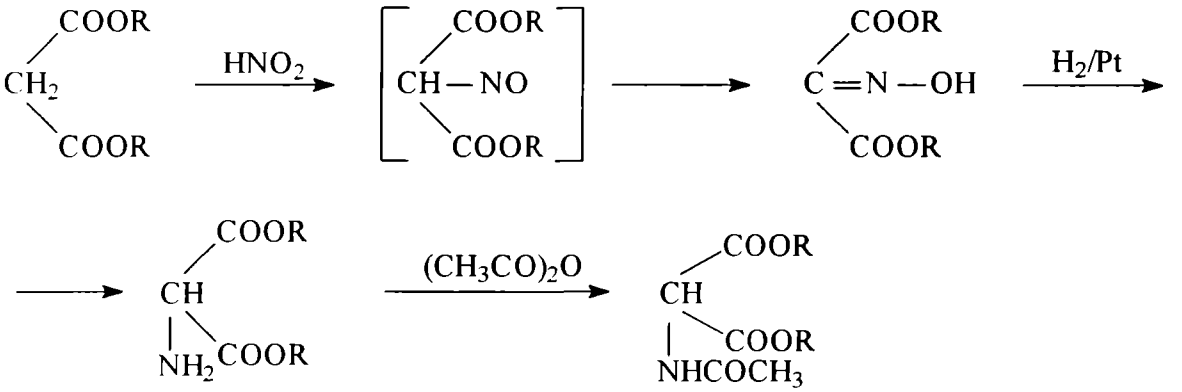


C. Metoda Gabriel – Fischer este o modificare a precedentei, pentru obținere de diaminoacizi monocarboxilici, care utilizează derivați alchilici dihalogenați și ester malonic sodat:



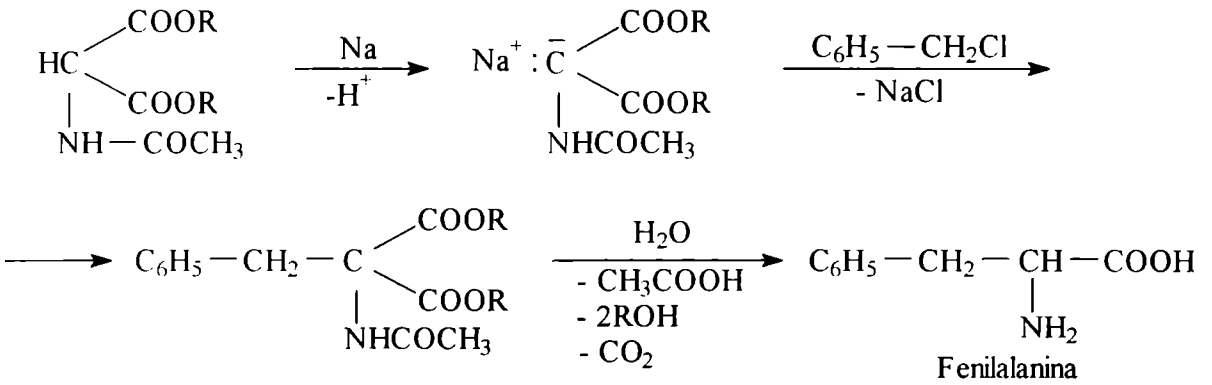
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

D. Sinteze cu ester acetilaminomalonic, reactiv care se obține din ester malonic:



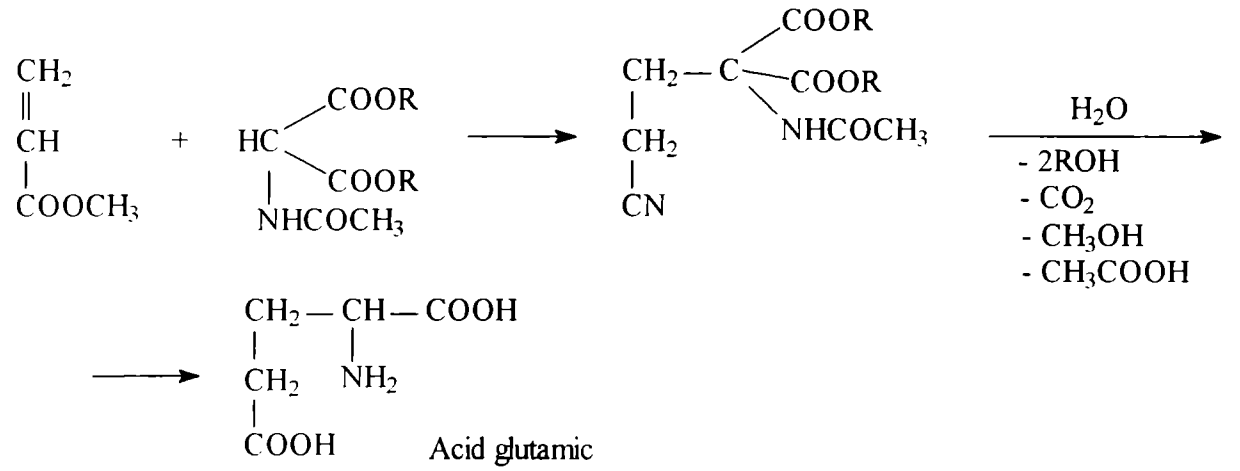
Ester acetilaminomalonic

Cu acest reactiv se pot sintetiza: alanina, valina, leucina, fenilalanina.



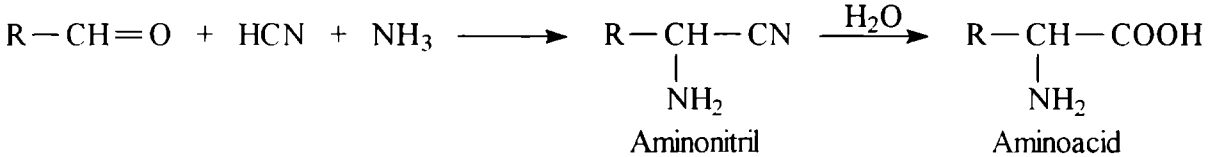
Fenilalanina

Se poate obține și acid glutamic, prin adiția esterului N-acetilaminomalonic la nitril sau ester acrilic:



Acid glutamic

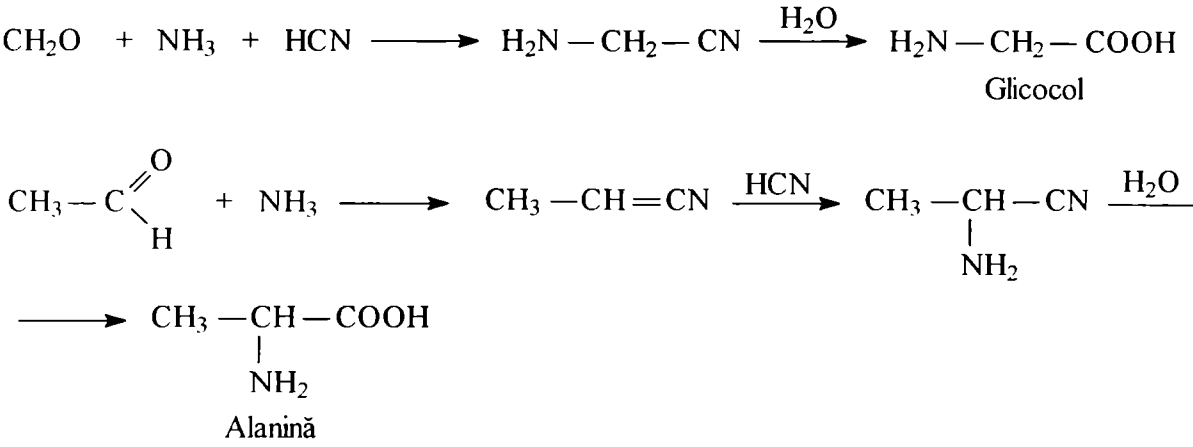
E. Sinteza Strecker utilizează ca materii prime aldehide și cianură de amoniu instabilă, obținută din cianură de sodiu și clorură de amoniu, după schema generală:



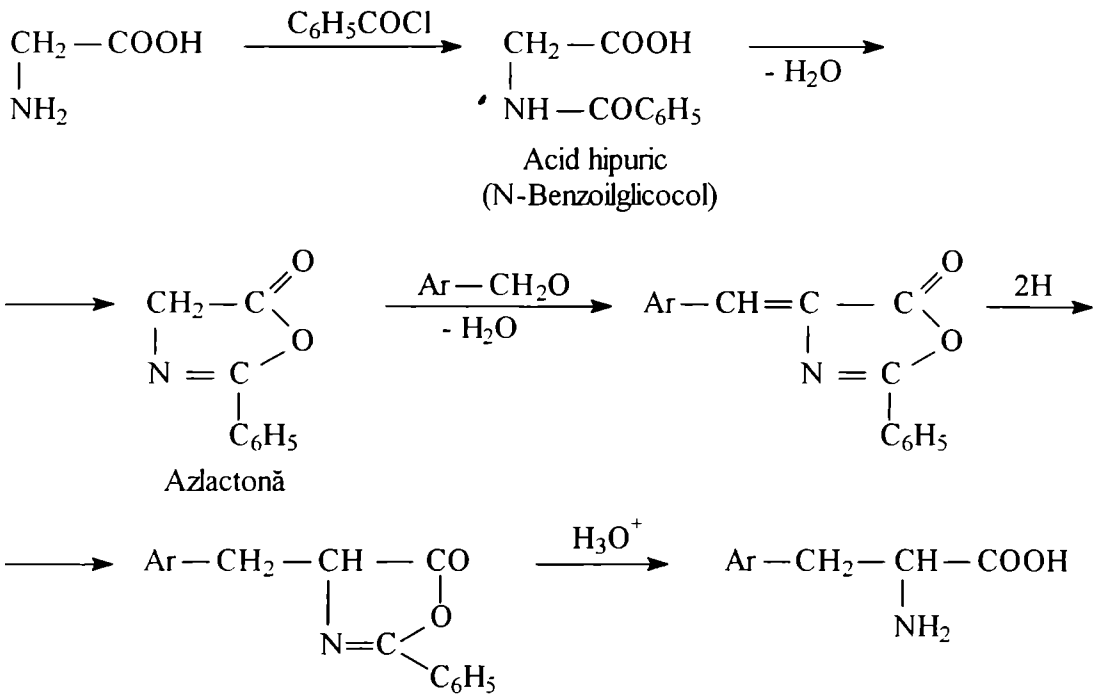
Aminonitril Aminoacid

Pe această cale se obțin aminoacizi monocarboxilici, alifatici și aromatici:

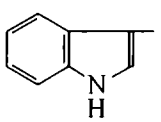
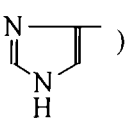
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



F. Metoda Perkin cu acid hipuric şi aldehide se utilizează pentru obținerea α-aminoacizilor aromatici sau heterociclici, după schema generală:



Prin această metodă se pot obține: fenilalanina (Ar = C_6H_5-); triptofanul

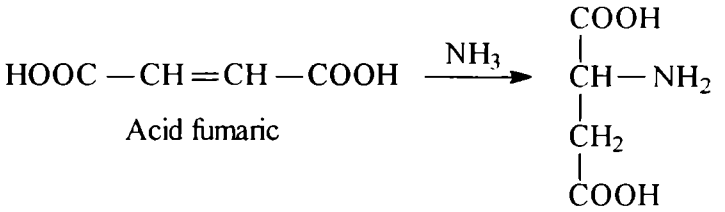
(Ar = ); histidina (Ar = )

G. Metode speciale se utilizează pentru sinteza unor termeni individuali din clasa α-aminoacizilor.

De exemplu:

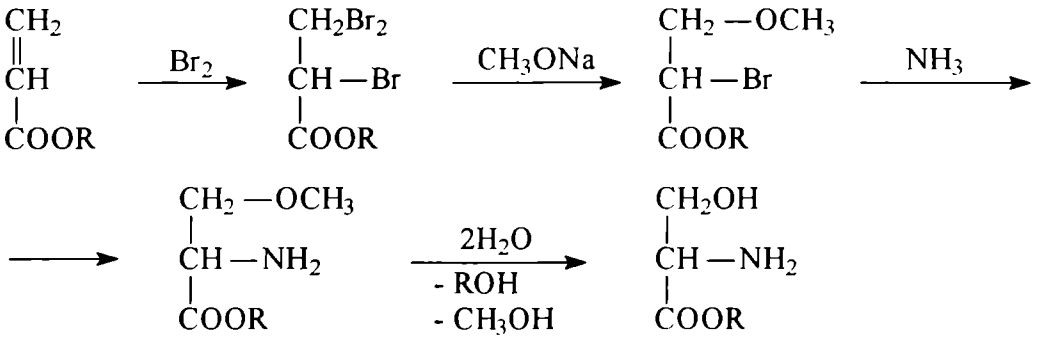
- acidul aspartic se obține prin tratarea acidului fumaric cu amoniac, la temperatură şi presiune:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

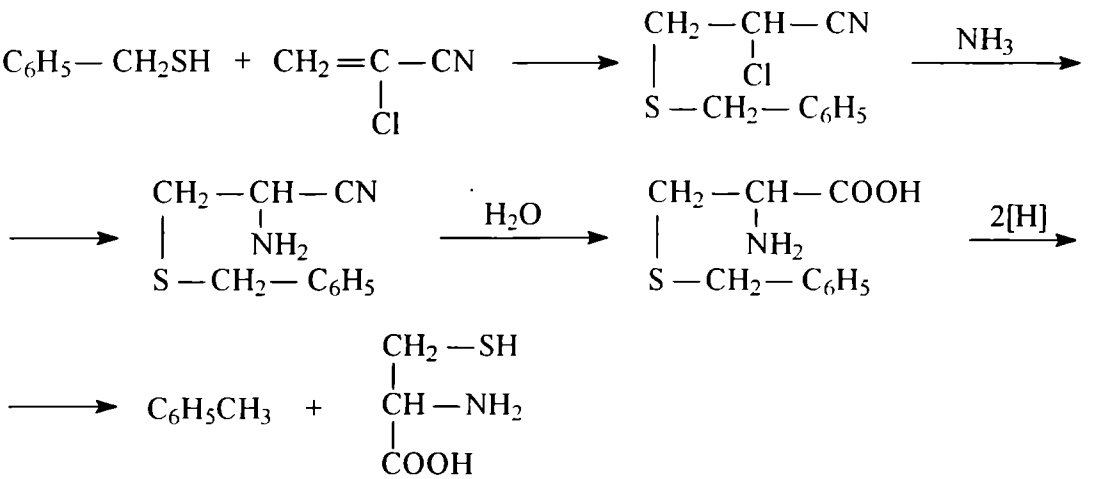


Acid fumaric

- serina se poate sintetiza pornind de la acrilați:



- cisteina rezultă prin adiția alcoolului tiobenzilic la 1-cloroacrilonitril, urmată de aminare:



II.1.3.2. Metode biochimice de obținere

Aceste metode utilizează enzimele, biocatalizatori chirali cu enanatiospecificitate, pentru obținerea L-aminoacizilor în stare optic pură.

Există trei căi principale de obținere pe cale biochimică a L-α-aminoacizilor:

- sinteza asimetrică totală;
- hidroliza enzimatică a proteinelor;
- hidroliza enantiospecifică a racemicilor de α-aminoacizi rezultați la sinteza chimică organică.

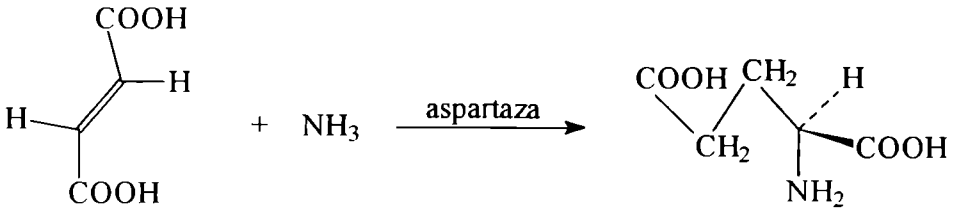
A. Sinteza asimetrică totală

Prin sinteză asimetrică totală se înțelege transformarea unui substrat achiral exclusiv în unul din enantiomerii produsului de reacție.

Pe această cale se obțin L-aminoacizi naturali, plecând de la molecule achirale; în prezența unor sintetatze specifice:

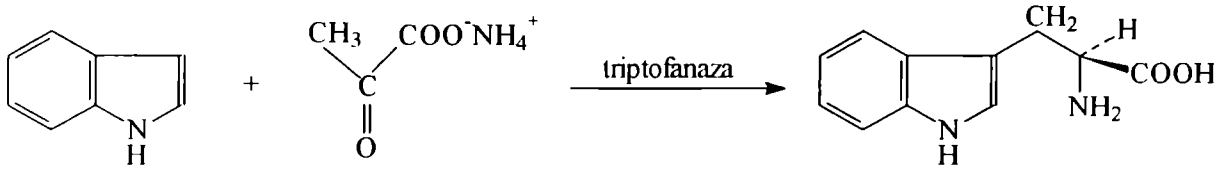
- Acidul aspartic se sintetizează de la acid fumaric şi amoniac, în prezența aspartazei:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



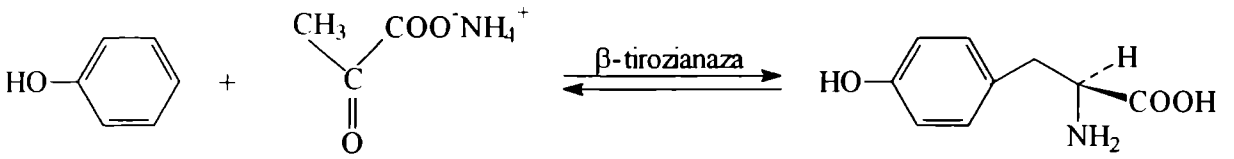
L Asp

- Triptofanul se obține din indol și piruvat de amoniu, în prezența triptofanazei:



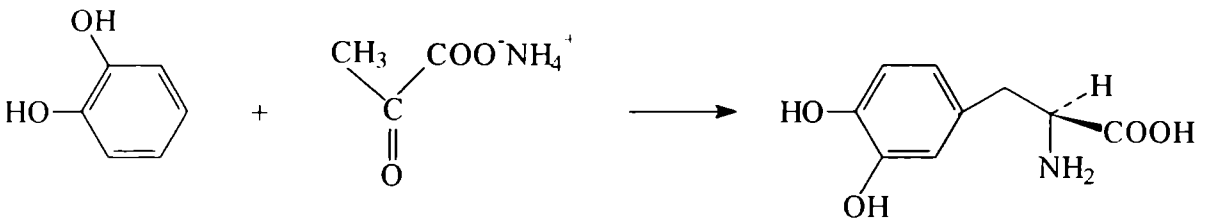
Indol L Trp

- În mod asemănător, din fenol și piruvat de amoniu rezultă tirozina; enzima care catalizează reacția este β tirozinaza din ciuperci:



L Tyr

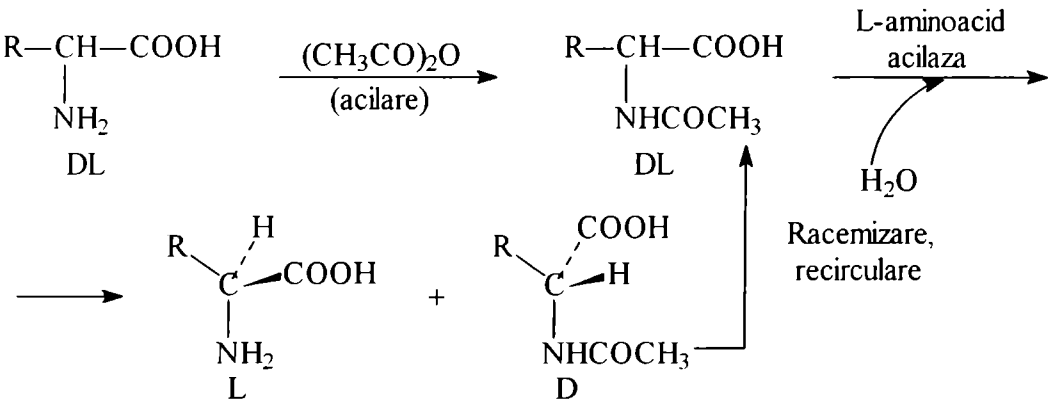
Reacția a fost aplicată și la sinteza medicamentului L-DOPA, utilizat în tratarea maladiei Parkinson:



L-DOPA

B. Scindarea enantiospecifică a derivaților aminoacizilor racemici

B.1.O cale de obținere a L-aminoacizilor din racemicii lor utilizează o L-aminoacidacilază. Substratul specific este derivatul N-acilat al aminoacidului, care este hidrolizat enzimatic:



Solubil în apă, insolubil în solvenți organici

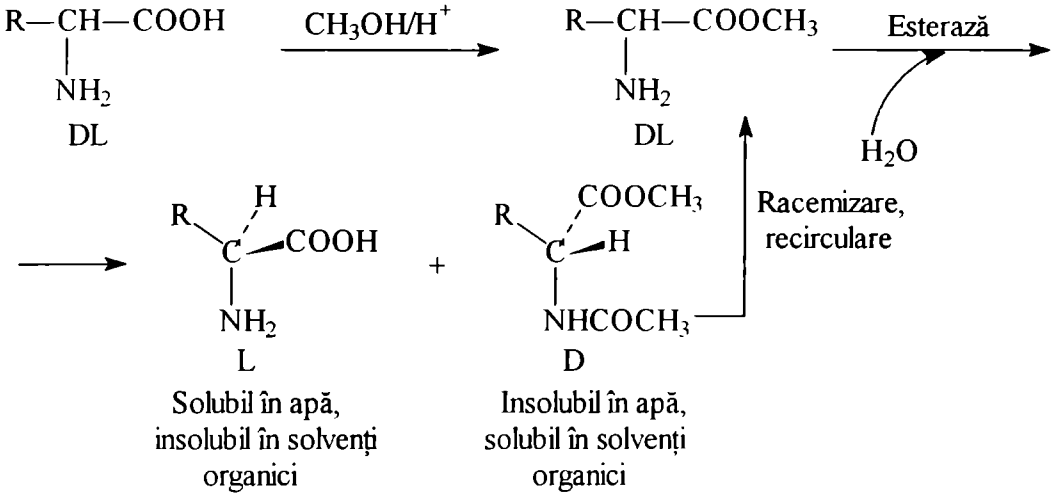
Insolubil în apă, solubil în solvenți organici

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

L-Aminoacidul se separă de D-aminoacidul N-acilat pe baza diferenței de solubilitate.

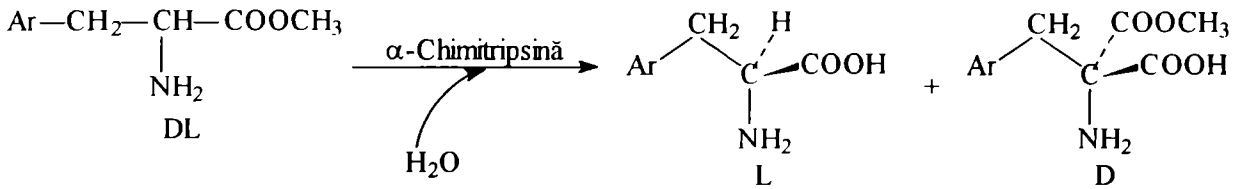
Pe această cale s-au obținut cu ajutorul unor bioreactoare: L-Met, L-Val, L-Phe, L-Trp.

B.2. Racemicii de α-aminoacizi mai pot fi scindați și prin intermediul esterilor lor, cu ajutorul unor esteraze specifice:



Pe această cale se pot obține L-Phe și L-Trp, prin hidroliza stereospecifică a esterilor lor cu subtilisina de origine microbiană.

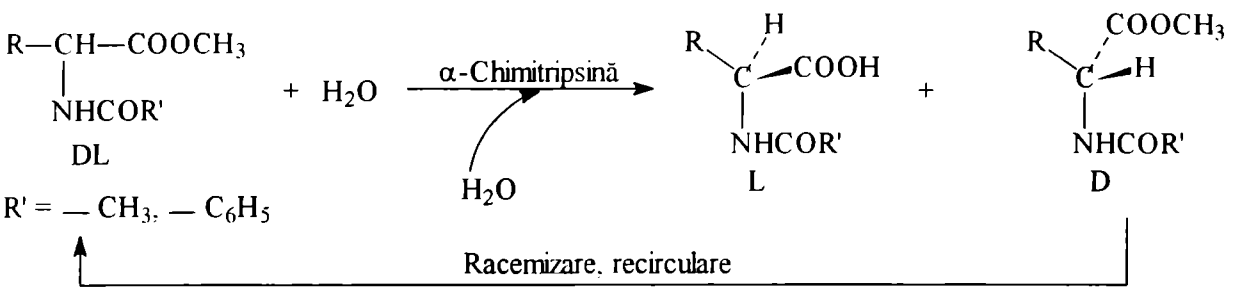
α-Chimotripsina izolată din pancreasul bovin este o esterază care catalizează hidroliza enantiospecifică a esterilor L-aminoacizilor aromatici și heterociclici (Phe, Tyr, Trp):



Metoda are însă aplicabilitate restrânsă; dacă se lucrează în mediu apos, randamentele sunt scăzute din mai multe cauze:

- în prezența chimotripsinei, esterii α-aminoacizilor se polimerizează;
- produsul secundar al hidrolizei (esterul D-aminoacidului) este inhibitor pentru enzimă;
- dacă hidroliza durează un timp mai îndelungat, enzima își pierde stereospecificitatea.

B.3. Pe scară mai largă se utilizează chimotripsina pentru scindarea enatiospecifică a esterilor L-aminoacizilor N-acilați:



L-Aminoacidul N-acilat și esterul D-aminoacidului N-acilat se separă pe baza solubilității lor selective în solvenți și in apă, la pH=7.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C. Hidroliza controlată a proteinelor

Prin hidroliza proteinelor naturale cu proteaze şi peptidaze, se pot obține L-aminoacizi.

De exemplu, β-lactoglobulina se hidrolizează aproape complet la aminoacizii componenți, utilizând pronază şi leucinaminopeptidază. Utilizând aceleaşi enzime, caseina se hidrolizează în proporție de 80%.

Această metodă nu se foloseşte în mod curent pentru obținere de L-aminoacizi. Hidroliza enzimatică a proteinelor urmăreşte mai ales creşterea digestibilității unor proteine cu valoare economică scăzută şi utilizarea hidrolizatelor obținute pentru hrana animalelor.

II.1.4. Proprietăți fizice ale α-aminoacizilor

α-Aminoacizii sunt substanțe solide, cristaline, incolore, solubile în apă şi insolubile în solvenți organici; datorită structurii lor amfiionice, au puncte de topire ridicate (peste 250°C) şi nu se pot distila, deoarece la încălzire puternică se descompun.

Cu excepția glicocolului, toți ceilalți α-aminoacizi naturali "standardizați" sunt optic activi.

La pH fiziologic, ambele grupe din α (NH_2 şi COOH) sunt ionizate. În plus, α-aminoacizii care conțin în restul hidrocarbonat (R) grupe ionizabile (OH, COOH, NH_2 etc.) prezintă valori distincte ale pK_R (tabel nr. II.5).

Tabel nr. II.5

Valori ale pK pentru grupele ionizate din α-aminoacizi "standardizați", la 25°C

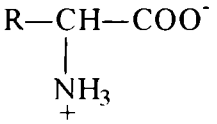
Nr. crt.	α-Aminoacidul	pK_1 α-COOH	pK_2 $\alpha-\overset{+}{N}H_3$	pK_R catenă
0	1	2	3	4
1	Ala	2,35	9,87	
2	Arg	1,82	8,99	12,48 (guanidino)
3	Asn	2,1	8,84	
4	Asp	1,99	9,90	3,90 (β-COOH)
5	Cys	1,92	10,78	8,33 (sulfhidril)
6	Glu	2,10	9,47	4,07 (γ-COOH)
7	Gln	2,17	9,13	
8	Gly	2,35	9,78	
9	His	1,80	9,33	6,04 (imidazol)
10	Ile	2,32	9,76	
11	Leu	2,33	9,74	
12	Lys	2,16	9,18	10,79 ($\varepsilon-\overset{+}{N}H_3$)
13	Met	2,13	9,28	

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

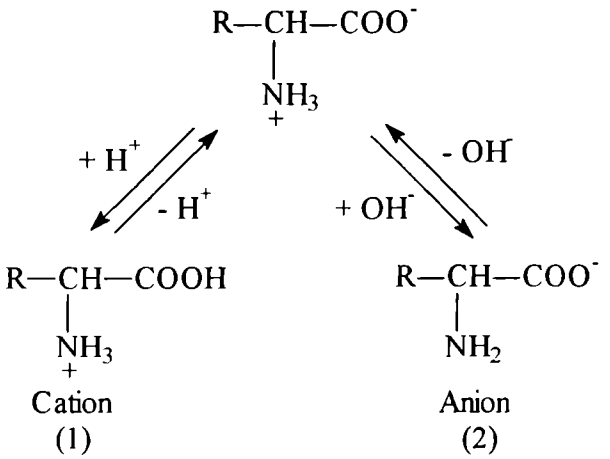
Tabel nr. II.5 (continuare)

0	1	2	3	4
14	Phe	2,16	9,18	
15	Pro	2,95	10,65	

Ţinând cont de considerentele anterioare, structura corectă a unui aminoacid în stare solidă se reprezintă sub formă de amfiion:



În consecinţă, α-aminoacizii pot fi titraţi atât cu acizi cât şi cu baze:

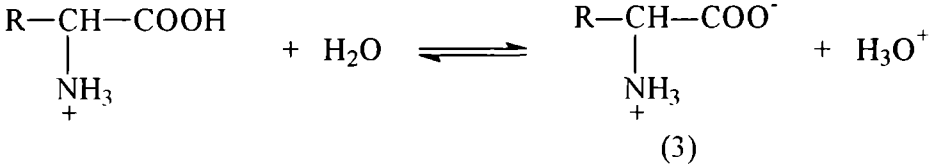


În soluţie apoasă, coexistă în echilibru toate cele trei forme: amfiionul (în mare exces), cationul şi anionul.

Adăugând la soluţia apoasă a unui aminoacid ioni de OH^- sau H^+, pH-ul soluţiei nu se modifică semnificativ. Această comportare stă la baza utilizării α-aminoacizilor pentru tamponarea unor medii de reacţie în biochimie, în analitică, în unele sinteze organice, la condiţionarea produselor farmaceutice etc.

Existenţa structurii de amfiioni (amfoliţi) a aminoacizilor a fost dovedită prin comportarea acestora în spectrele de absorbţie IR, prin momentele lor de dipol mari, prin efectul de mărire a constantei dielectrice a apei în care sunt dizolvaţi. De asemenea, punctele de topire ridicate, valorile mari ale densităţilor (datorate forţelor cristaline de reţea puternice), stabilitatea crescută a aminoacizilor în solvenţi polari, ca şi insolubilitatea lor în solventi organici (mai ales nepolari) sunt tot atâtea argumente pentru structura amfiionică.

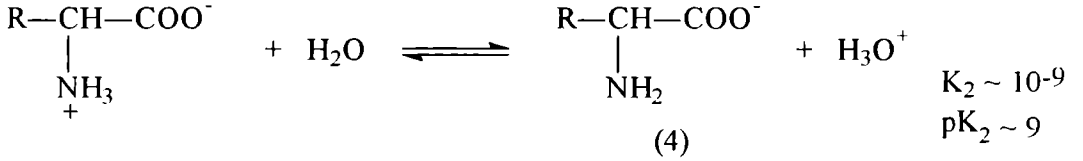
Aminoacizii fără grupe ionizabile în radicalul hidrocarbonat prezintă două constante de disociere:



$K_1 \sim 10^{-2}$

$pK_1 \sim 2$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

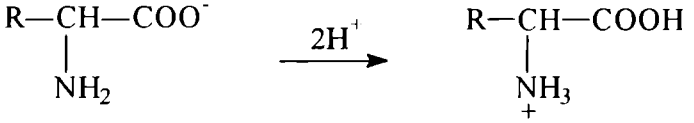


(4)

Deoarece $K_1 > K_2$, în soluția apoasă a aminoacidului, pe lângă excesul mare de amfiioni, există o mică concentrație de anioni. Din această cauză soluția nu este neutră, având un pH slab alcalin. Dacă în soluție se introduc doi electrozi între care se aplică o diferență de potențial, se observă migrarea ionilor spre electrozi (mobilitate electroforetică).

Pentru ca soluția să devină neutră, este necesară titrarea sa cu o cantitate de acid, diferită de la un aminoacid la altul.

Punctul izolelectric se definește ca o valoare a concentrației ionilor de hidrogen, la care concentrațiile anionilor și cationilor sunt egale:



La punctul izoelectric încetează mobilitatea electroforetică, iar solubilitatea aminoacidului în apă este minimă.

În cazul în care aminoacidul nu mai are și alte grupe ionizabile în moleculă, punctul său izoelectric (pH_i sau P_i) este o medie aritmetică a celor două constante de disociere:

$$pH_i = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2)$$

Aminoacizii care au în catena hidrocarbonată grupe ionizabile au și constante de ionizare caracteristice acestora (pK_R din tabelul nr. II.5).

În acest caz, punctul izoelectric nu mai poate fi anticipat prin însumarea constantelor de disociere individuale.

II.1.5. Proprietăți chimice ale α-aminoacizilor

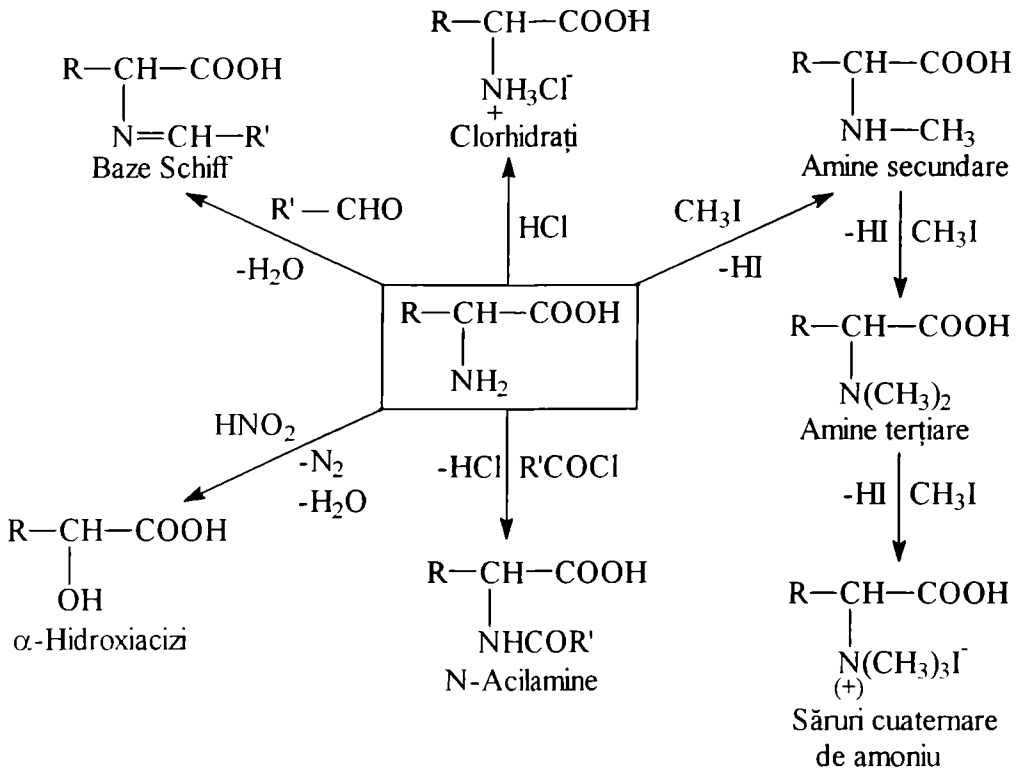
Deoarece α-aminoacizii fac parte din clasa compușilor organici multifuncționali, vor prezenta proprietăți specifice atât grupelor COOH și NH_2, cât și altor grupe existente în radicalul hidrocarbonat, dar și proprietăți legate de natura acestui radical (alchil, aromatic, heterociclic).

În plus, apar și reacții chimice specifice datorate poziției reciproce a celor două grupe funcționale de la atomul C_α.

II.1.5.1. Proprietăți chimice datorate prezenței grupei NH_2

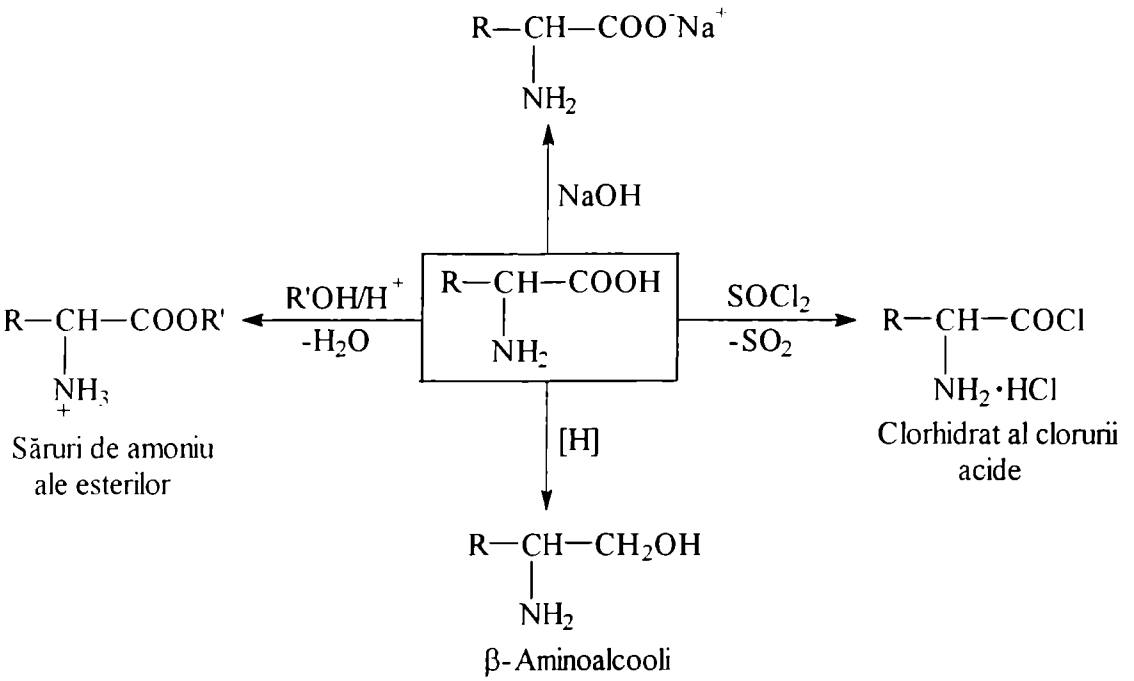
Ca orice amină primară, α-aminoacizii dau reacțiile caracteristice ale acestora: săruri cu acizii, alchilarea, acilarea, reacții de condensare cu compuși carbonilici, dezaminarea cu acid azotos etc.:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



II.1.5.2. Reacții specifice grupei COOH

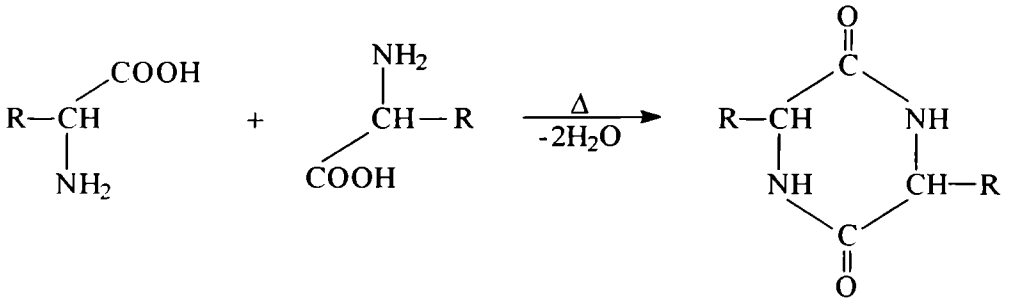
În această categorie intră transformarea grupei COOH în funcțiuni derivate (esteri, cloruri acide, săruri), dar şi reacții de reducere:



II.1.5.3. Reacții datorate prezenței ambelor grupe funcționale la C_α

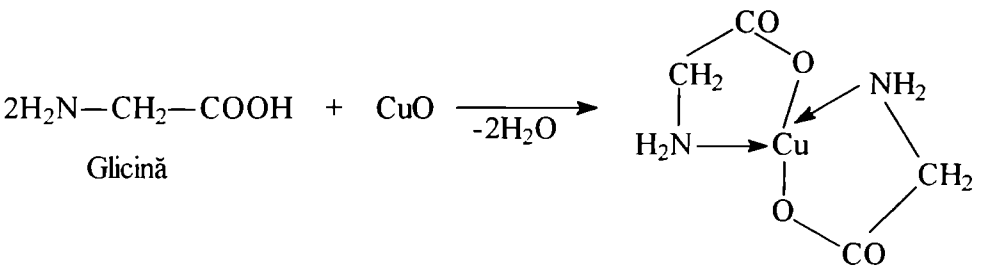
A. La încălzire, α-aminoacizii suferă o reacție de condensare bimoleculară, cu formare de dicetopiperazine:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Dicetopiperazină

B. α-Aminoacizii formează combinații complexe (compuși chelați) cu metalele tranziționale (cu lipsă de octet) ca: Fe, Al, Zn, Cu, V, Co, Cr, în care aminoacidul este donor, iar metalul – acceptor:



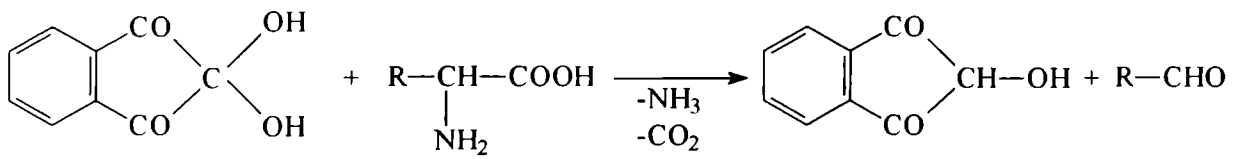
Glicină

Bisglicinat de cupru

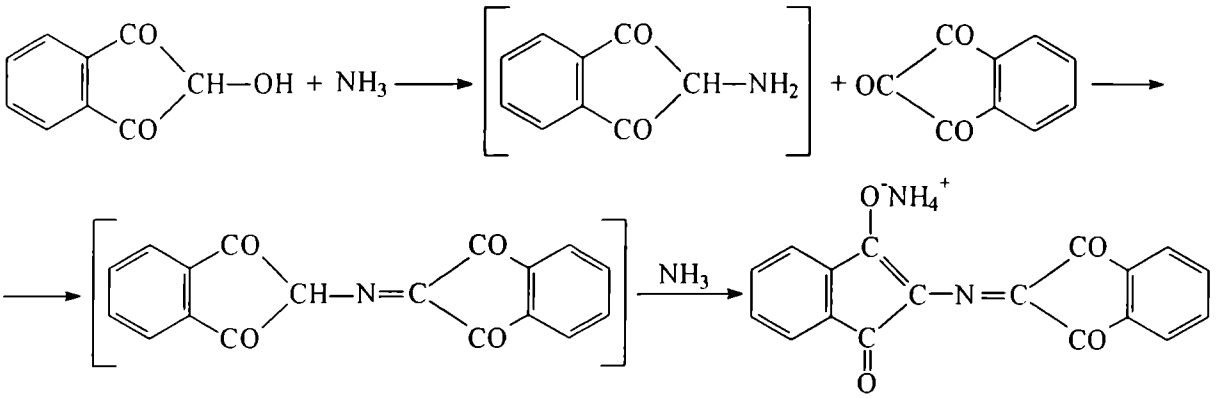
Aceste combinații complexe sunt stabile, insolubile în apă și se utilizează la dozarea metalelor respective.

C. O proprietate deosebit de importantă, care servește la identificarea și dozarea α-aminoacizilor individuali este reacția cu ninhidrina. În această reacție se formează compuși colorați în diverse nuanțe de albastru și violet (cu absorbție maximă în vizibil la λ=570 nm). Absorbțiile servesc și la dozarea aminoacizilor componenți ai proteinelor.

Reacția cu ninhidrină este complexă; un mecanism probabil este următorul:



Ninhidrină



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

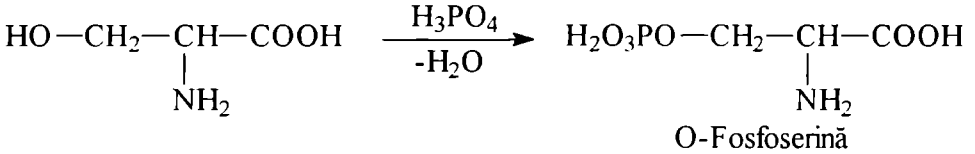
De fapt, nuanța de culoare nu depinde de natura aminoacidului, în compoziția colorantului cu ninhidrină intrând doar azotul amoniacului degajat în reacție.

II.1.5.4. Reacții datorate radicalilor R

Resturile hidrocarbonate ale α-aminoacizilor, polare sau nepolare, vor da reacții caracteristice scheletului hidrocarbonat și grupelor funcționale pe care le conțin. În cele ce urmează vor fi ilustrate câteva asemenea exemple.

A. Grupele –OH prezente în radicalul R (din serină, treonină, tirozină) pot forma esteri cu acizii organici sau anorganici.

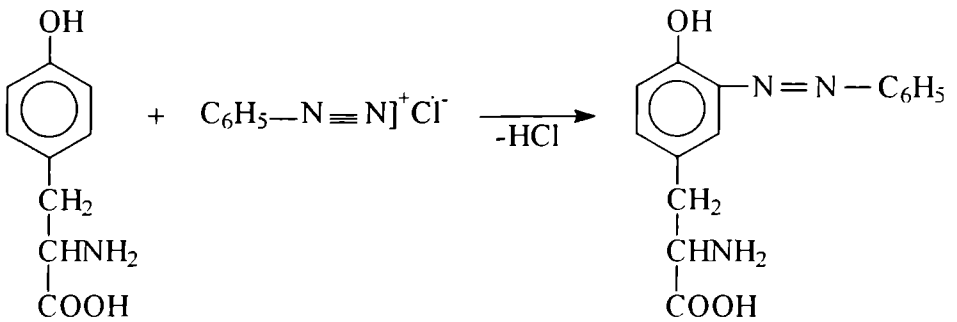
Astfel, serina se poate esterifica cu acid ortofosforic, conducând la fosfoserină:



O-Fosfoserină

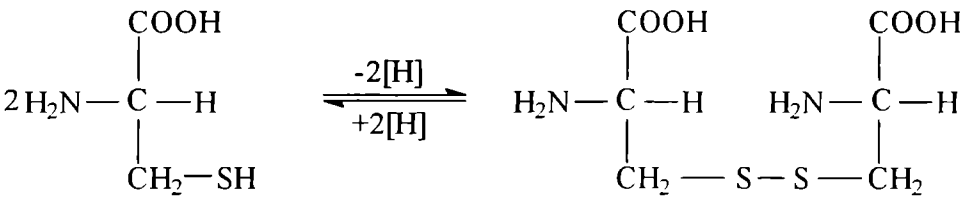
B. Aminoacizii aromatici și heteroaromatici (fenilalanină, tirozină, triptofan, histidină) pot participa la reacții de substituție aromatică electrofilă.

De exemplu, tirozina se poate cupla cu săruri de diazoniu, conducând la compuși azoici:



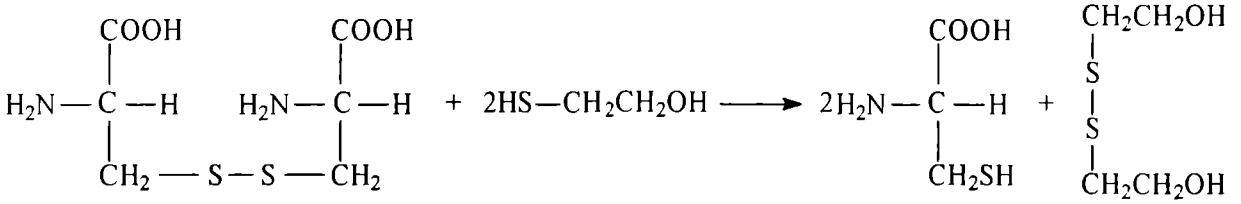
C. Grupa tiol din cisteină, extrem de reactivă, poate participa la reacții de oxidare și de reducere, în condiții blânde.

Astfel, cisteina se poate dehidrogena chiar în prezența oxigenului atmosferic, conducând la cistină:



Cys Cistină (Cy)

La rândul ei, cistina se poate reduce la cisteină, sub influența unor agenți reducători slabi, ca β-mercaptoetanolul:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Modificări ale resturilor de aminoacizi din proteine au loc după biosinteza lanțului proteic polipeptidic. Astfel, aminoacizii componenți ai proteinelor implicate în complexe cu acizi nucleici (proteine ribozomale și cromozomiale) pot suferi metilări, acetilări și/sau fosforilări specifice.

II.1.6. Transformări biochimice ale α-aminoacizilor

Biosinteza (sursă endogenă) aminoacizilor esențiali nu este posibilă în organismele animale superioare, pentru care sursa principală de asemenea compuși o reprezintă proteinele din hrană (sursă exogenă).

Aminoacizii naturali "standardizați" neesențiali pot fi însă biosintetizați de aceste organisme, în principal prin transaminare. Capacitatea organismelor animale de a biosintetiza aminoacizi diferă în funcție de specie și de vârstă. Astfel, organismele în curs de creștere ca și cele slăbite de boală nu pot sintetiza arginina în cantități suficiente.

Uneori, o parte din cei 20 de aminoacizi naturali se pot substitui între ei: tirozina se biosintetizează din fenilalanină (dar nu și invers); cisteina se poate obține din metionină.

Aminoacizii proveniți din surse exogene (proteine din alimentație) servesc la rândul lor la biosinteza proteinelor specifice organismelor (enzime, hormoni etc.), precum și a altor substanțe biologic active (hem, glutation, amine, nucleotide, coenzime etc.). Ei sunt și precursori ai glucozei, acizilor grași, ai corpilor cetonici și ai combustibililor genetici.

Excesul de aminoacizi rezultați prin scindarea proteinelor din hrană nu este stocat; ei sunt excretați într-o mică proporție, majoritatea fiind convertiți la α-cetoacizi cu rol de intermediari metabolici ca: piruvatul (intermediar al multor căi metabolice la toate tipurile de celule și specii), acidul oxaloacetic (care se transformă în acid aspartic și intră în ciclul urogenetic), acidul α-cetoglutaric (care se transformă în acid glutamic, intermediar în ciclul ureei).

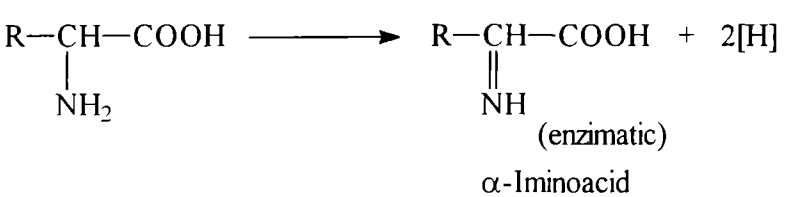
II.1.6.1. Dezaminarea oxidativă a aminoacizilor

Prin dezaminarea aminoacizilor aflați în exces în organism se formează în principal amoniac, uree și acid uric, restul organic fiind convertit în lipide sau hidrați de carbon.

Pe lânga amoniac, prin dezaminarea oxidativă a aminoacizilor se formează și α-cetoacizi. Acest lucru a fost demonstrat de către Krebs (1933), care a observat ca aminoacizii tratați cu felii de ficat sau rinichi (în care sunt prezente aminoacid oxidazele) se convertesc la acizi α-cetonici.

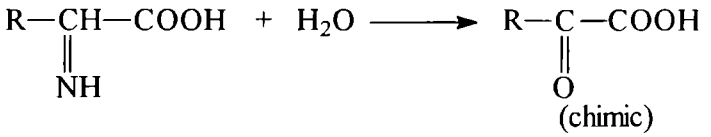
Enzimele care catalizează această transformare sunt de mai multe feluri: D-aminoacid oxidaze, L-aminoacid oxidaze, precum și aminoacid oxidaze (dehidrogenaze) specifice.

Transformarea include două etape, dintre care numai prima este enzimatică și decurge în prezența unor coenzime acceptoare de hidrogen (FAD, NAD^+ sau $NADP^+$):

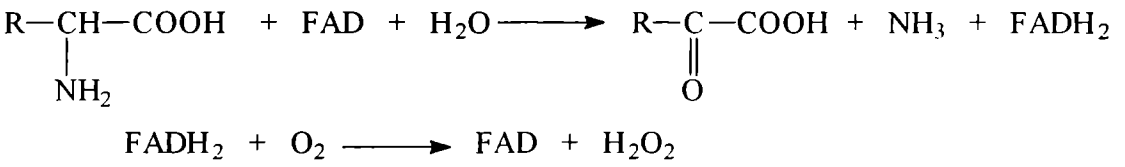


α-Iminoacid

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Atât L-aminoacid oxidaza cât şi D-aminoacid oxidaza sunt FAD dependente:



Întrucât D-aminoacizii apar foarte rar în natură (asociaţi cu membranele celulare bacteriene), rolul biologic al D-aminoacid oxidazelor este puţin cunoscut. Se pare că D-aminoacizii sunt mai întâi convertiţi la α-cetoacizi, iar aceştia sunt utilizaţi la biosinteza α-L-aminoacizilor, prin transaminare.

În urma dezaminării oxidative se formează amoniac care este excretat ca atare doar de animalele acvatice (în mediul cărora amoniacul, de altfel toxic pentru organism, este diluat imediat). Acestea sunt organisme amonolitice.

În cazul verterbratelor terestre la care apa este în cantitate mică, amoniacul este convertit în uree ca produs de excreţie. Ureea se formează în ficat (în mitocondrii) prin ciclu ureei (fig.II.1) pe cale enzimatică, după care trece în circulaţia sângelui, este reţinută de rinichi şi excretată prin urină. Aceste vertebrate sunt deci organisme ureolitice.

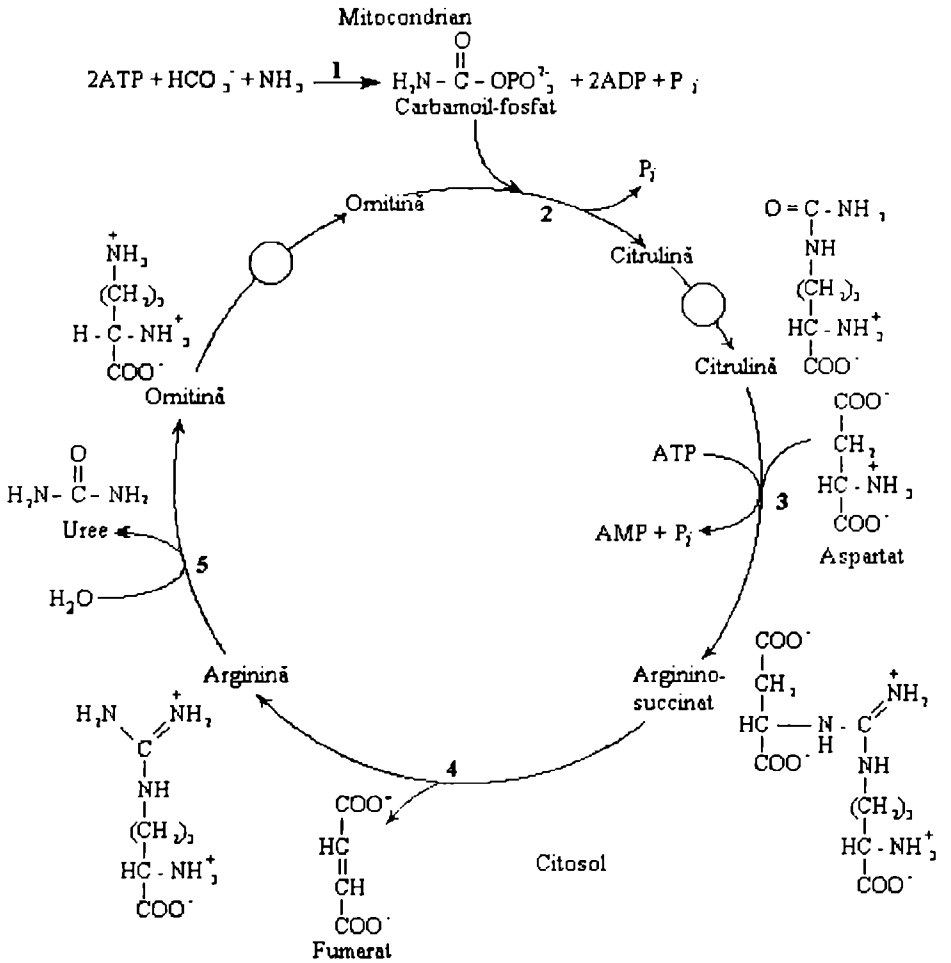


Fig. II.1 Ciclul ureei

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

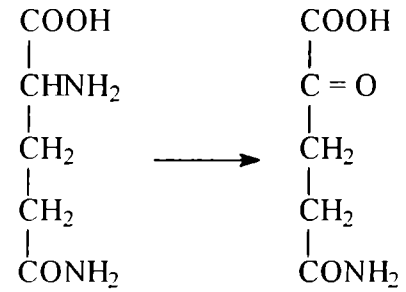
Cantitatea de uree eliminată zilnic este direct influențată de cantitatea de proteine animale ingerate prin hrană.

Valorile fiziologice normale ale eliminării de uree prin urină sunt cuprinse la omul adult în domeniul 250-500 μmoli/l/24h.

Dereglări ale funcțiilor renale pot fi observate mai ales prin diminuarea acestor valori sub limita minimă, fiind determinate de nefropatii. Un diagnostic corect se poate pune corelând rezultatele obținute la determinarea ureei sanguine cu cea urinară.

Și dozarea amoniacului sanguin (de proveniență exo- și endogenă) poate da referințe asupra metabolismului proteinelor și aminoacizilor.

În special în ficat și în rinichi, amoniacul rezultă prin dezaminarea oxidativă a aminoacizior, dar și prin hidroliza glutaminei sau a acidului α-cetoglutaric.



Glutamină Acid glutaramic

Deși flora bacteriană din tractul intestinal produce cantități însemnate de amoniac, cantități foarte mici ajung în circulația sângelui. Amoniacul, toxic pentru celulele cerebrale, este mobilizat în procesul glutaminogenezei din ficat. Aceasta explică de ce, la pH=7,4 conținutul în ioni de amoniu din plasmă este de 98%, în timp ce amoniacul liber este prezent în proporție de maxim 2%.

Un alt produs de excreție provenit de la amoniac este acidul uric, la păsări și reptile terestre (organisme uricolitice).

Unii aminoacizi (serina, histidina) se pot dezamina neoxidativ, sub influența enzimelor numite deaminaze, cu generare de amoniac.

II.1.6.2. Transaminarea

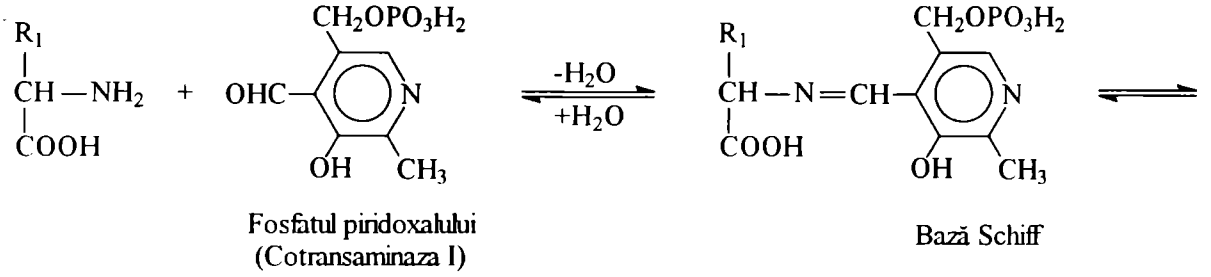
Principala cale de dezaminare a aminoacizilor este transaminarea, un proces în care are loc un transfer al grupei NH_2 de la un α-aminoacid (donor) pe un α-cetoacid (acceptor):

Enzimele (transferaze din grupa E.C.1) care catalizează această reacție se numesc transaminaze; ele sunt dependente de cofactori numiți cotransaminaze derivate de la piridoxină (vitamina B_6): fosfatul piridoxalului (cotransaminaza I) și fosfatul piridoxaminei (cotransaminaza II).

Transaminarea are două etape esențiale:

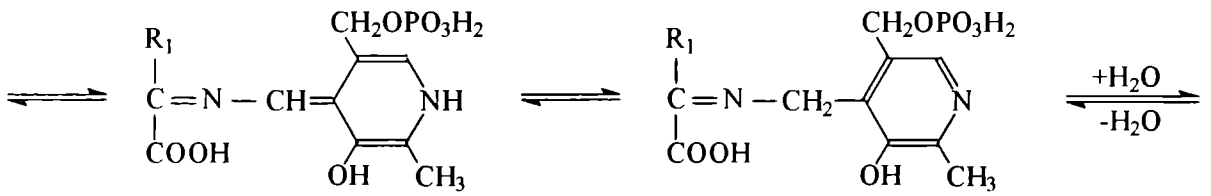
A. Conversia unui α-aminoacid la un α-cetoacid:

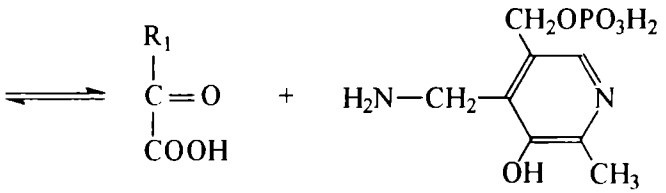
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Fosfatul piridoxalului
(Cotransaminaza I)

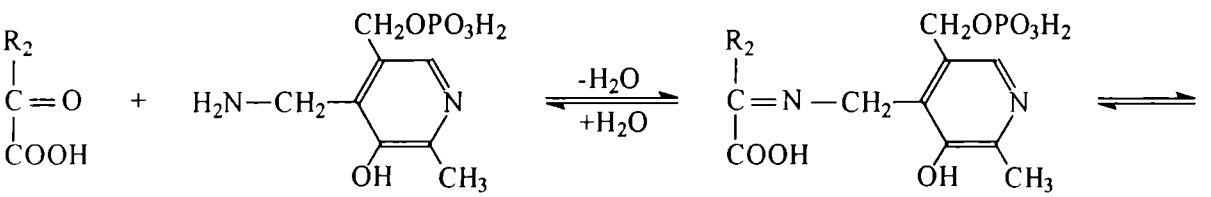
Bază Schiff



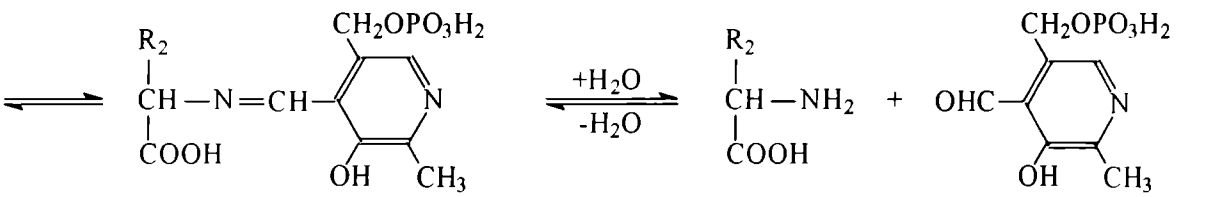


Fosfatul piridoxaminei
(Cotransaminaza II)

B. Conversia unui α-cetoacid la un α-aminoacid, cu regenerarea cotransaminazei I:



Bază Schiff



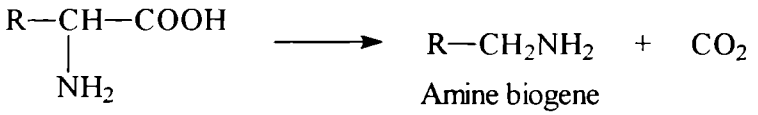
Această reacție reprezinta calea principală pentru sinteza aminoacizilor în organismele animale, în prezența acizilor α-cetonici (acid piruvic, acid oxalilacetic, acid 2-cetoglutaric). α-Cetoacizii sunt foarte răspândiți în organisme, fiind intermediari în metabolismul hidraților de carbon.

Organismul animal își sintetizează numai acei α-cetoacizi care conduc (prin transaminare) la α-aminoacizi neesențiali.

II.1.6.3. Reacții de decarboxilare

În prezența unor microorganisme ca *Bacterium coli* şi *Bacillus subtilis*, care produc enzime specifice (aminoacid decarboxilaze), are loc eliminarea dioxidului de carbon din α-aminoacizi, cu formare de amine biogene:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



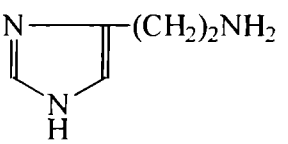
Aminoacid decarboxilazele acceptă în calitate de cofactor piridoxal-fosfatul.

Aminele biogene formate au diverse funcții biologice: precursori în biosinteza unor enzime, vitamine, hormoni, acțiune farmacodinamică, toxicitate etc.

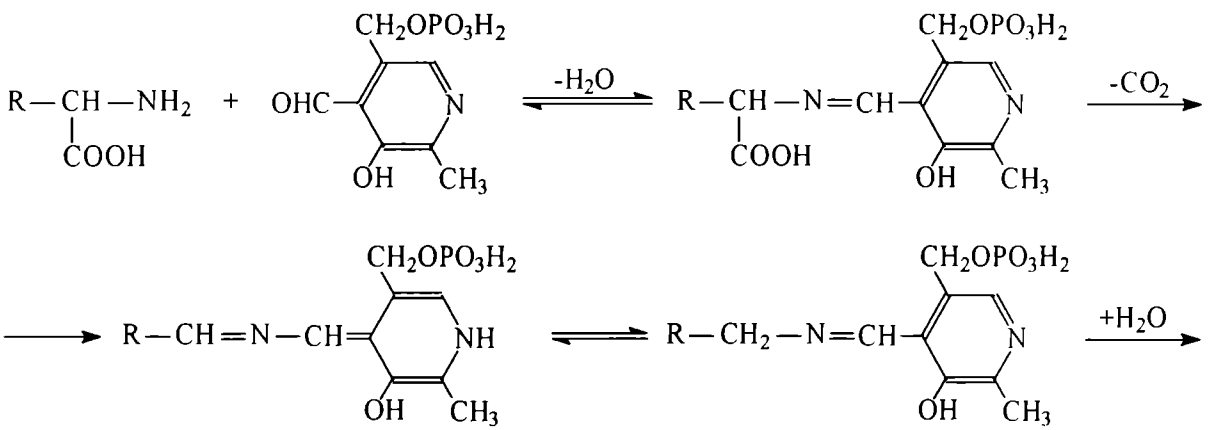
În tabelul nr. II.6 sunt date câteva exemple de amine biogene.

Tabel nr. II.6

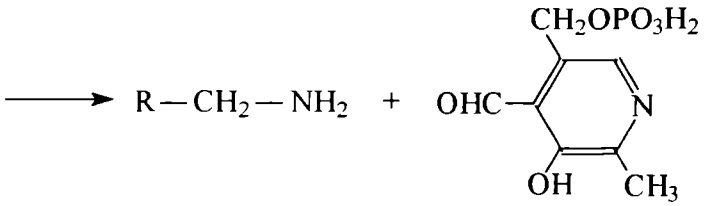
Amine biogene (surse, acțiune biologică)

Nr. crt.	Sursă (aminoacid)	Aminoacid decarboxilaza	Amină biogenă	Acțiune fiziologică
1	$H_2N-(CH_2)_3-CH(NH_2)-COOH$ Ornitină	Ornitin-decarboxilaza	$H_2N(CH_2)_4NH_2$ Putresceină	Toxică
2	Lisină	Lisin-decarboxilaza	$H_2N(CH_2)_5NH_2$ Cadaverină	Toxică
3	Histidină	Histidin-decarboxilaza	 Histamină	Vasodilatator (Hipertensiv)
4	Cisteină		$HS-(CH_2)_2-NH_2$ Cisteamină	Component al coenzimei A
5	Acid aspartic	Aspartat-decarboxilaza	$HOOC-(CH_2)_2NH_2$ β-Alanină	Component al coenzimei A şi acidului pantotenic

În prima fază, mecanismul decarboxilării aminteşte pe cel al transaminării:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

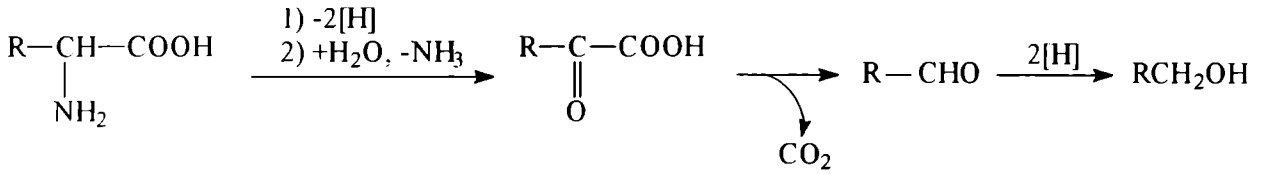


II.1.6.4. Dezaminarea şi decarboxilarea simultane

Aceste transformări au loc sub influenţa drojdiei de brutărie.

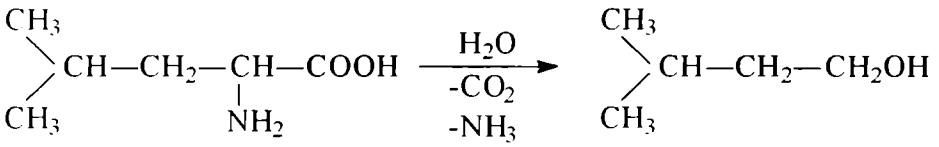
În mediul fermentaţiei alcoolice catalizate de drojdie se formează şi α-aminoacizi prin hidroliza proteinelor prezente în materialul supus fermentaţiei. Are loc o reacţie enzimatică multisecvenţială, catalizată de complexul enzimatic din drojdie.

Etapa intermediară (de formare a α-cetoacidului) aminteşte de dezaminarea oxidativă. Acidul α-cetonic format intermediar suferă o decarboxilare sub influenţa carboxilazei şi a cocarboxilazei, după care are loc etapa finală a reducerii aldehidei, similară cu cea de la fermentaţia alcoolică:

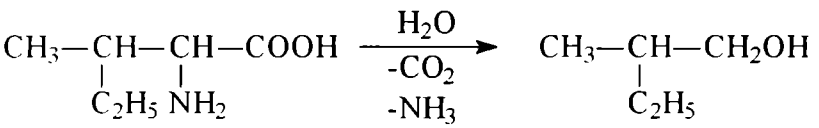


Final, se formează alcooli primari, cu un atom de carbon mai puţin decât α-aminoacizii de la care provin.

Pe această cale, în cozile de distilare a alcoolului etilic de fermentaţie apar alcoolii izoamilici primari, proveniţi de la leucină şi izoleucină:



Leu

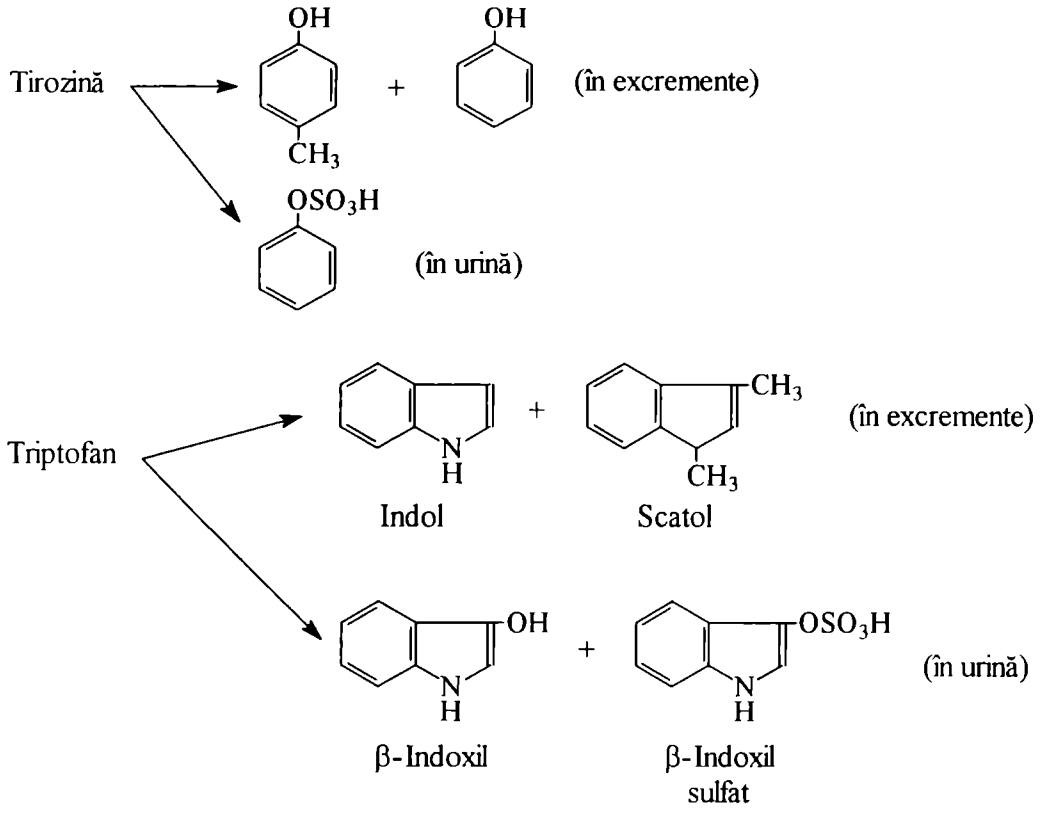


Ile

II.1.6.5. Alte transformări biochimice ale aminoacizilor

Degradări avansate ale aminoacizilor au loc în intestinul gros, sub influenţa bacteriilor de putrefacţie. Degradările afectează catenele laterale din moleculele α- aminoacizilor. Produşii de degradare sunt excretaţi:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



II.2. Peptide

Prin condensarea α-aminoacizilor, cu eliminare de apă, se formează peptidele şi proteinele, a căror grupă caracteristică este funcția peptidică (amidică):

$$H_2N-\underset{\underset{R}{|}}{CH}-CO-NH-\underset{\underset{R'}{|}}{CH}-CO-NH\ldots-\underset{\underset{R^x}{|}}{CH}-COOH$$

Notând cu n numărul de resturi de aminoacizi din catenă, se consideră că peptidele au n = 2-100, iar proteinelor le corespunde n > 100.

O altă clasificare se poate face după masa moleculară a compuşilor. Inițial, peptidele au fost clasificate ca având mase care ajung până la 10kDa, peste această valoare domeniul aparținând proteinelor.

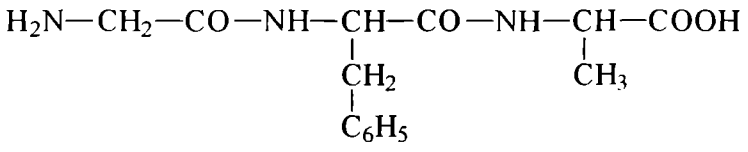
Ulterior, după descoperirea şi investigarea unor proteine naturale, cu mase mai mici de 10 kDa (de exemplu, insulina cu masa = 6 kDa), s-a convenit că poliamidele cu mase moleculare de sub 5 kDa se încadrează în categoria peptidelor, peste această valoare situându-se proteinele.

La rândul lor, peptidele se pot clasifica după numărul de resturi de aminoacizi din moleculă în:

- oligopeptide (cu n = 2-10), care pot fi: dipeptide, tripeptide, ... decapeptide, şi
- polipeptide (cu n = 10-100).

Atât reprezentarea formulei structurale cât şi denumirea peptidelor începe de la capătul corespunzând aminoacidului N-terminal (din stânga), după care se înşiruie denumirile aminoacizilor din secvență (cu sufixul il) şi se termină cu aminoacidul C-terminal, căruia i se specifică denumirea integrală:

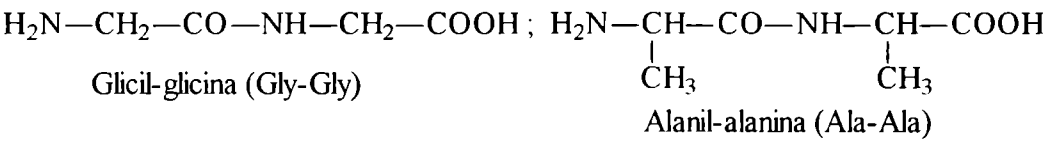
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Glicil-fenilalanil-alanină (Gly-Phe-Al)

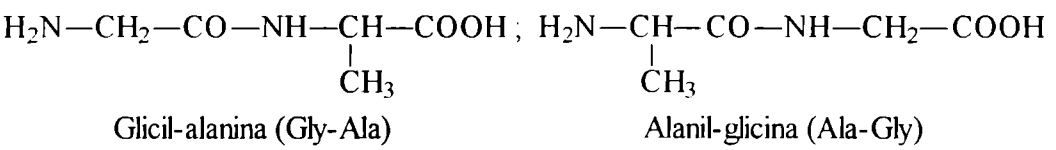
După natura aminoacizilor componenți, peptidele pot fi: simple (compuse din același aminoacid) sau mixte (compuse din aminoacizi diferiți). Astfel, din glicină și alanină se pot obține:

- două peptide simple:



Glicil-glicina (Gly-Gly) Alanil-alanina (Ala-Ala)

- două peptide mixte:



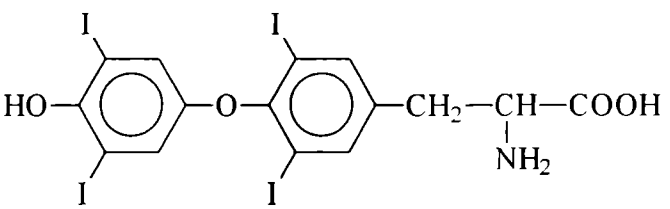
Glicil-alanina (Gly-Ala) Alanil-glicina (Ala-Gly)

La scrierea polipeptidelor și proteinelor sunt utilizate de obicei numai prescurtările convenționale. În afară de aceste reguli de nomanclatură, peptidele și proteinele naturale au și denumiri comune, folosite mai des (glutation, carnozină, penicilină, insulină, albumină, caseină etc.).

II.2.1. Structura primară a peptidelor

Întrucât peptidele sunt modele simplificate ale proteinelor, studiul structurii lor reprezintă punctul de plecare pentru determinarea structurii proteinelor. Ca și proteinele, peptidele prezintă o structură primară, prin care se înțelege tipul, secvența aminoacizilor din catenă și raportul lor cantitativ.

Cei 20 de α-aminoacizi naturali standardizați prezenți în hormoni, enzime și în toate proteinele pot conduce la un număr infinit de combinații. Totuși, activitatea lor biologică nu este întâmplătoare, ea fiind determinată de înlănțuirea aminoacizilor într-o ordine (secvență) foarte precisă. Astfel, chiar și un simplu aminoacid poate avea activitate biologică. Este cazul tiroxinei, un hormon tiroidian activ al animalelor, derivat de la tirozină:

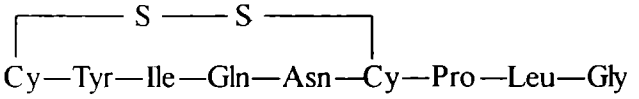


Tiroxina

Această moleculă relativ simplă, joacă un rol important în metabolismul al aproape fiecărei celule din organism.

Oxitocina și bradikinina sunt oligopeptide compuse din nouă aminoacizi, legați în secvențe diferite:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Oxitocina

Arg—Pro—Pro—Gly—Phe—Ser—Pro—Phe—Arg

Bradikinina

Oxitocina este responsabilă de contracțiile uterine din cursul nașterii și acționează asupra glandelor mamare în timpul lactației, pentru a stimula expulzarea laptelui.

Bradikinina, produsă de globulinele din plasma sanguină ca răspuns la o înțepătură de viespe, este un agent puternic, responsabil de apariția durerii.

Este deci evident că o modificare în secvența aminoacizilor din bradikinină sau din oxitocină, cum ar fi: o substituire, o dispariție sau o adăugare, va modifica profund activitatea lor biologică.

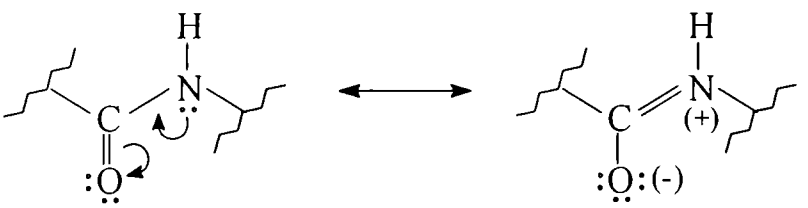
Unele proteine naturale, cu lanț polipeptidic relativ mic, pot avea aceeași funcție pentru diverse specii, fără a prezenta neapărat o structură primară identică. Astfel, insulina, un hormon care controlează metabolismul glucidelor, diferă prin aranjamentul a 4 din cei 51 aminoacizi ai săi, în fiecare din numeroasele specii care o conțin. Totuși, insulina bovină poate fi utilizată pentru a compensa deficiența în insulină a oamenilor suferinzi de diabet.

Cât privește proteinele care conțin mai mult de 100 de aminoacizi în lanțul polipeptidic, sunt dificil de transferat de la o specie la alta, din cauza problemelor imunologice care apar. Variații ale secvenței aminaocizilor se traduc prin conformații spațiale total diferite, ceea ce exclude posibilitatea transferării lor între specii.

Un exemplu este globina, proteina componentă a hemoglobinei, care este constituită din 146 aminoacizi într-o ordine foarte precisă, caracteristică speciei și orice modificare a acestei secvențe, privind chiar un singur aminoacid, poate determina apariția la om a unor maladii grave și chiar a morții. Astfel, anemia datorată hematiilor falciforme este o maladie moleculară și globina falciformă a celor atinși de această boală diferă de globina normală prin faptul că cel de al 6-lea aminoacid din secvența celor 146 este valina în loc de acidul glutamic. Victimele acestei maladii ereditare nu pot utiliza oxigenul la viteză normală și în consecință trebuie să evite altitudinile mari, la care oxigenul este rarefiat, orice efort fizic necesitând un consum intens de oxigen.

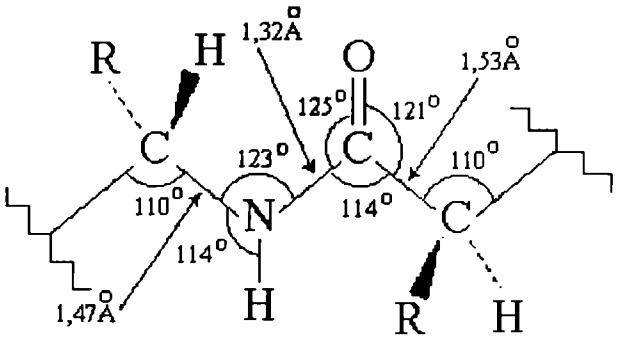
Moleculele polipetidice ale enzimelor sunt și mai complexe; fiecare celulă vie conține mii de enzime, fiecare fiind responsabilă de actiunea catalitică asupra unei reacții chimice bine precizate.

În grupa amidică din peptide și proteine, există o conjugare caracteristică, ceea ce face ca această grupă să adopte o configurație anticoplanară:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cum atomii de carbon chirali din α au structură tetraedrică (hibridizare sp^3), radicalii R ai α-aminoacizilor sunt orientați în spațiu de o parte și de alta a planului grupelor amidice:



Determinarea structurii primare a peptidelor și proteinelor

Metodele generale de determinare a structurii primare sunt aceleași, atât la peptide cât și la proteine. Acest lucru implică două obiective esențiale:

- analiza aminoacizilor componenți în scopul determinării naturii și raportului cantitativ dintre aminoacizii prezenți în lanțurile (poli)peptidice

- determinarea secvenței aminoacizilor ca și a aminaocizilor N- și C-terminali din lanțul peptidei sau proteinei.

Ambele deziderate se pot rezolva utilizând metode chimice, fizice și biochimice și corelând rezultatele obținute.

A. Analiza aminoacizilor

Peptidele (ca și proteinele) sunt hidrolizate cu HCl 6N la 105°C; nu se poate utiliza hidroliza bazică, în condițiile căreia are loc racemizarea la atomii de C_α. În timpul hidrolizei acide, L-triptofanul, mai puțin stabil, se descompune parțial, ceea ce necesită corecții în cazul determinărilor cantitative.

Pe de altă parte, glutamina și asparagina sunt complet hidrolizate la acid glutamic și respectiv acid aspartic, cu eliminare de amoniac.

Amestecul de aminoacizi obținut prin hidroliză se poate separa și analiza cu un analizor automat de aminoacizi. În acest aparat, probele conținând aminoacizii din amestec sunt trecute pe coloane cu schimbători de ioni, umplute cu o rășină pe bază de acizi sulfonici.

O primă coloană este menținută la pH=5,3 și utilizată pentru separarea aminoacizilor bazici, a amoniacului și triptofanului. A doua coloană, utilizată pentru alți aminoacizi, este menținută inițial la pH=3,2, prin trecerea a 250 cm^3 de eluent. Apoi pH-ul este ajustat până la 4,25, atât timp cât durează trecerea prin coloană a unor cantități de eluent de 250-500 cm^3.

Aminoacizii sunt eluați cu soluții tampon de citrat de sodiu, iar soluțiile obținute sunt încălzite în prezența ninhidrinei.

Un spectrofotometru măsoară absorbția optică a produșilor de reacție cu ninhidrina, înregistrând sub forma unei curbe reprezentative volumul de eluent (cm^3) în funcție de intensitatea culorii rezultate din reacția cu ninhidrina.

Poziția peak-ului (vârfului) (maximului) de absorbție (în cm^3) corespunzând volumului de tampon necesar pentru eluarea fiecărui aminoacid, este caracteristică acestuia. Prin integrarea

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ariilor cuprinse de benzile absorbție, se estimează proporția fiecărui aminoacid din molecula peptidică sau proteică.

Analiza unor mici cantități de aminoacizi se poate face și prin cromatografia în fază gazoasă, dar, deoarece aminoacizii sunt foarte puțin volatili, ei se transformă întâi în esteri (trimetilsililesteri) cu suficientă volatilitate.

B. Determinarea secvenței aminoacizilor din molecula unei peptide sau proteine

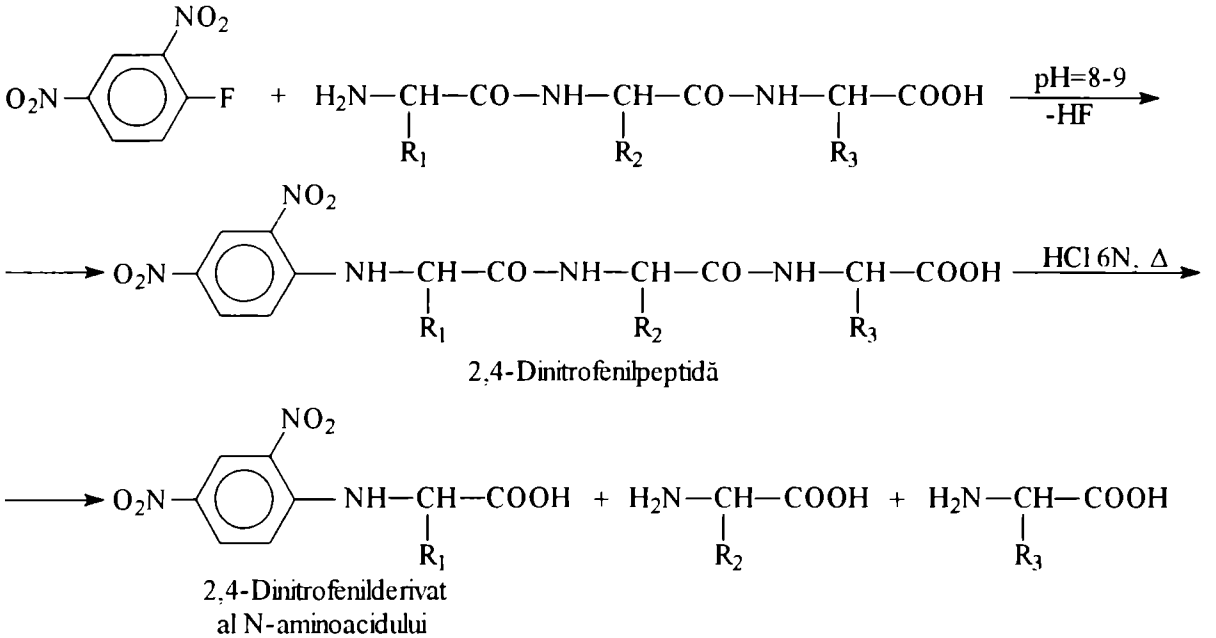
Stabilirea ordinii (secvenței) de legare a resturilor de aminocizii din catena peptidică implică în general și determinarea aminoacidului N-terminal și a celui C-terminal, scop în care sunt utilizate atât metode chimice, cât și biochimice.

B.1. Metode chimice

B.1.1. Determinarea aminoacidului N-terminal

B.1.1.1. Metoda Sanger

O tehnică experimentală curentă pentru determinarea aminoacidului N-terminal constă în reacția cu 2,4-dinitrofluoro-benzen (Sanger, 1949), când are loc o substituție aromatică nucleofilă:

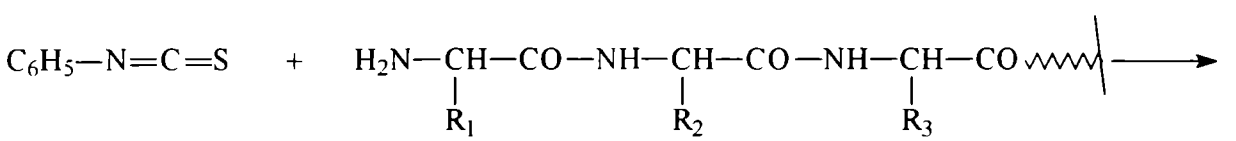


2,4-Dinitrofeniderivatul aminoacidului N-terminal (de culoare galbenă) se identifica prin cromatografie, utilizând ca probe martor dinitrofenilderivații α-L-aminoacizilor.

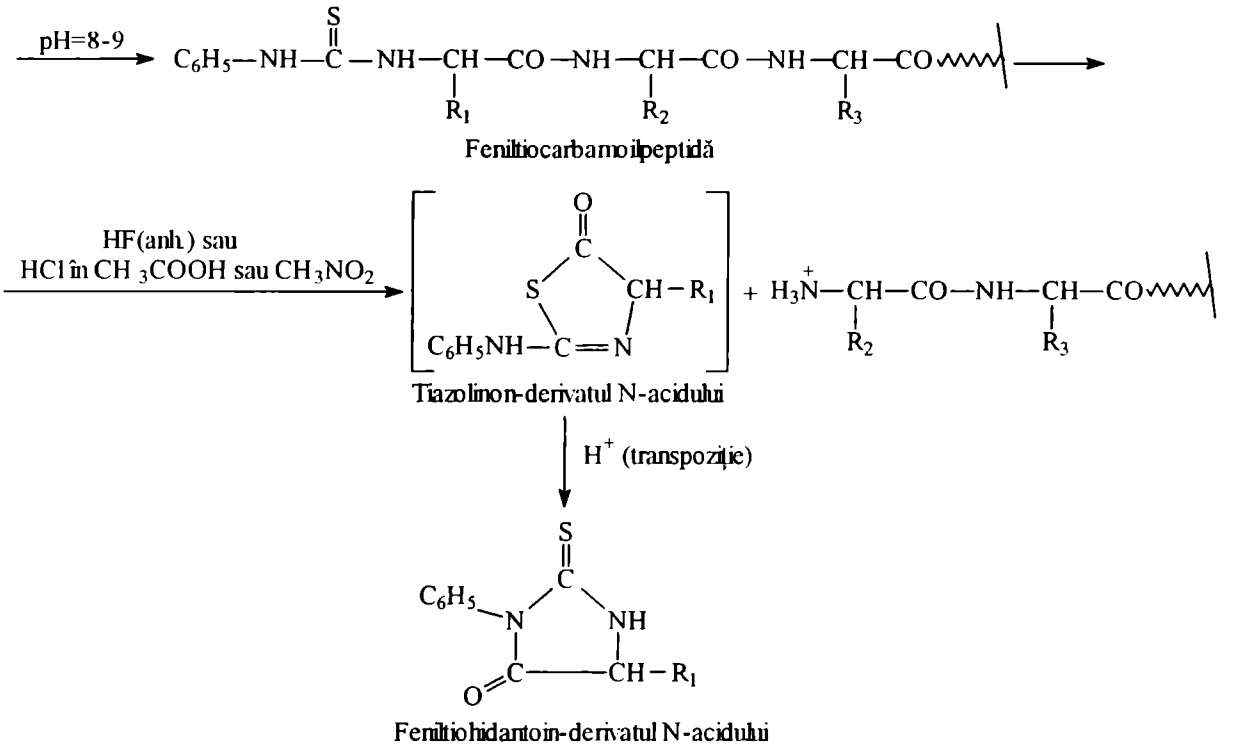
Metoda Sanger nu poate fi utilizată și la determinarea secvenței aminoacizilor, deoarece derivatul peptidic este hidrolizat până la aminoacizii componenți.

B.1.1.2. Metoda Edman

Această metodă folosește ca reactiv izotiocianatul de fenil (fenilsenevol) în mediu slab bazic:

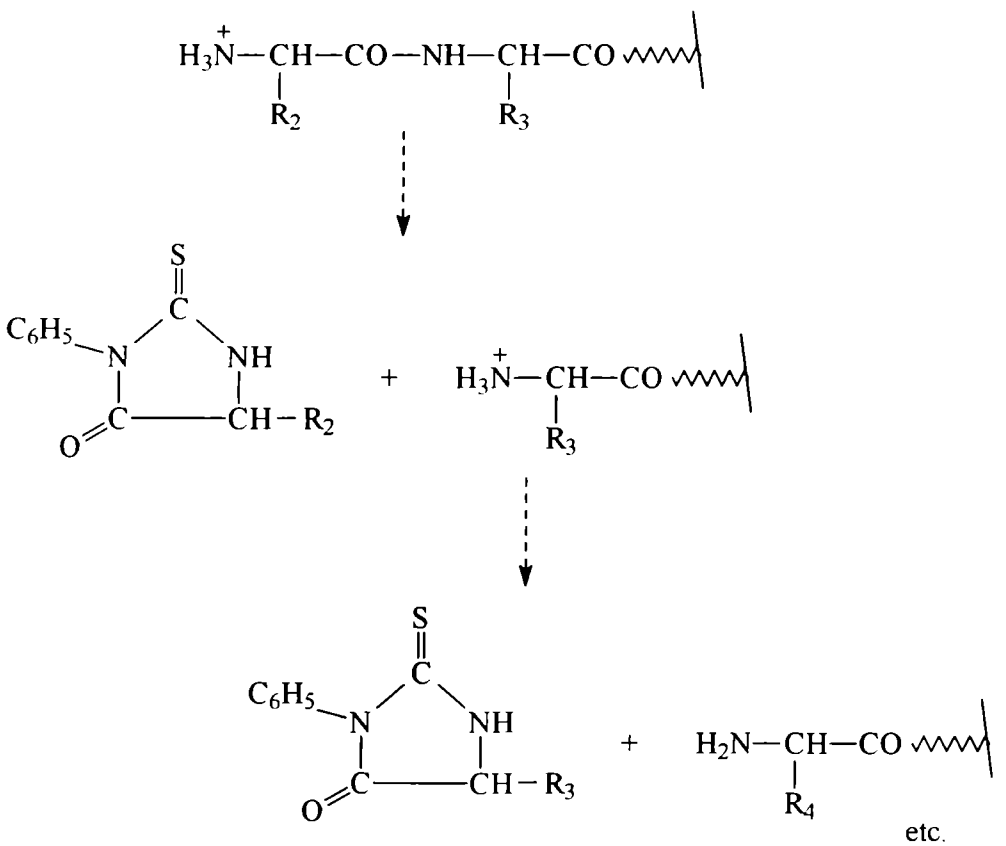


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Tiazolinon-derivatul N-acidului se extrage selectiv cu un solvent organic şi se supune transpoziției acide, cu formarea feniltiohidantoin-derivatului, mai stabil şi care poate fi identificat cromatografic (CSS, HPLC, GLC), prin electroforeză şi spectroscopia de masă.

Produsul secundar al reacției Edman este o peptidă mai scurtă, care se supune repetat aceloraşi operații, identificându-se rând pe rând, feniltiohidantoin derivații celorlați aminoacizi:

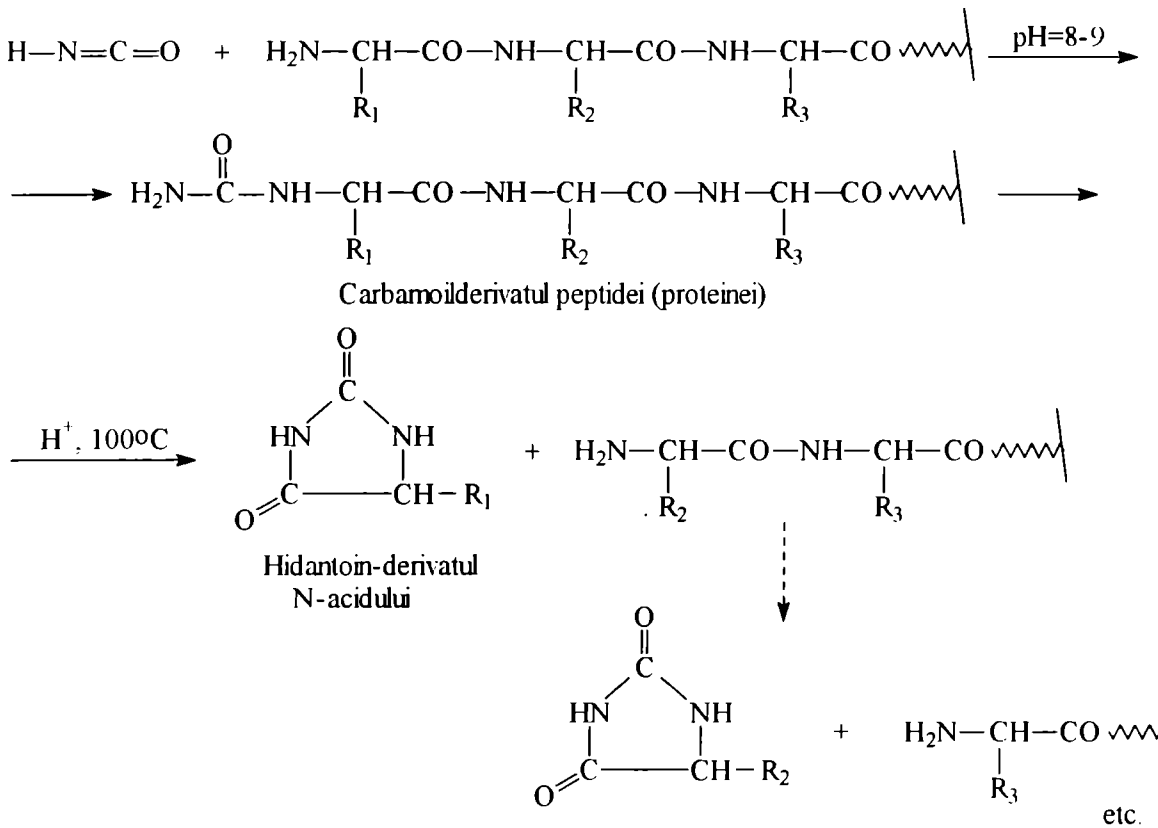


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metoda Edman poate fi folosită deci şi pentru determinarea secventei complete a aminoacizilor din structura primară a peptidelor sau proteinelor.

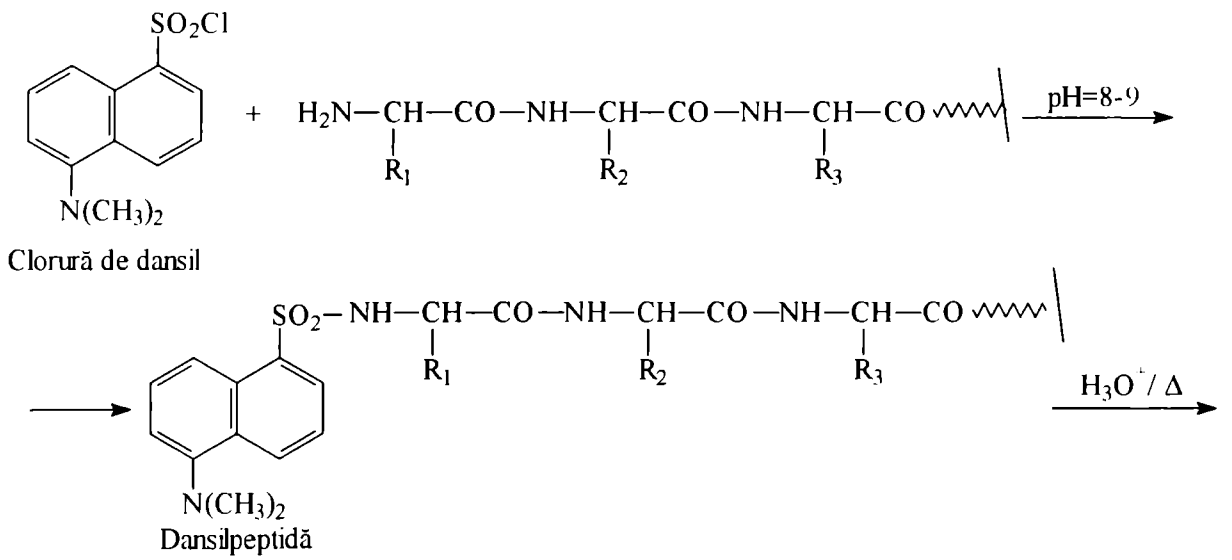
B.1.1.3. Metoda cu cianat

Acest procedeu este în fond o variantă simplificată a metodei Edman, în care peptida (sau proteina) este tratată cu acid cianic în mediu slab alcalin. Carbamoilpeptida formată intermediar se încălzeşte în mediu protonat cu formare de hidantoină substituită a N-aminoacidului şi a unei peptide mai scurte. Ca şi în cazul metodei Edman, procedeul cu cianat, aplicat repetat la peptidele din ce în ce mai scurte, se utilizează şi la determinarea secvenței aminoacizilor:

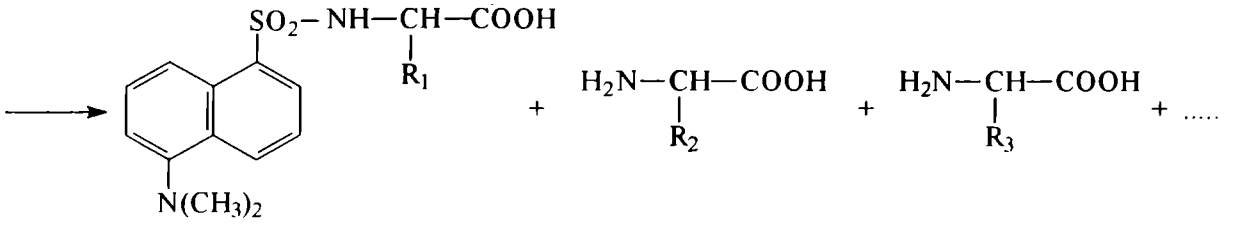


B.1.1.4. Metoda Hartley

Un reactiv sensibil, utilizat pentru identificarea aminoacidului N-terminal este clorura de dansil (clorura de 1-dimetilaminonaftalin-5-sulfonil):



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Dansilderivat al N-acidului

Hidroliza acidă a dansilpeptidei conduce la dansilderivatul N-aminoacidului şi la scindarea completă a restului lanţului peptidic în aminoacizii componenţi.

Dansilderivatul N-acidului este puternic fluorescent şi se poate identifica prin fluorimetrie, tehnică cu sensibilitate de 100 de ori mai mare în comparaţie cu metodele colorimetrice.

Datorită stabilităţii acestui derivat şi a sensibilităţii metodei, N-aminoacidul poate fi identificat şi dozat chiar în cantităţi extrem de mici (de ordinul nanogramelor).

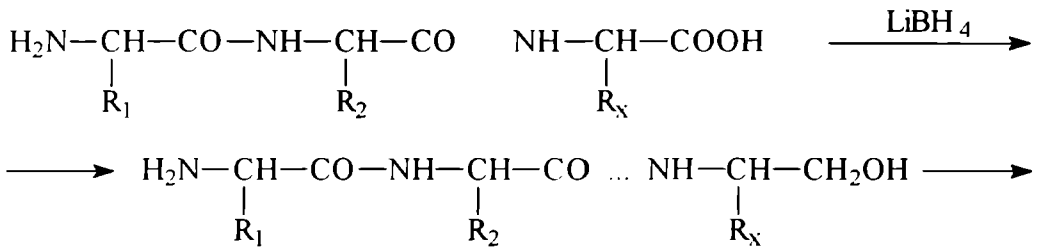
Metoda nu se poate utiliza la determinarea secvenţei aminoacizilor din lanţul (poli)peptidic.

B.1.2. Determinarea aminoacidului C-terminal

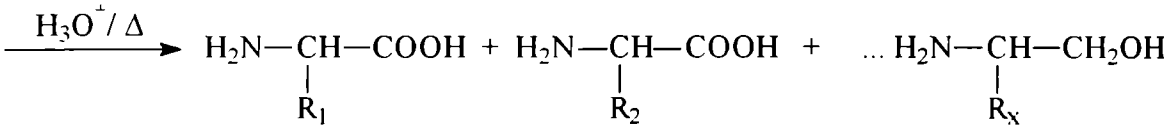
B.1.2.1. Metoda reducerii

Borohidrura de litiu reduce grupa carboxil C-terminală din lanţul (poli)peptidic, pe care o transformă în alcool primar.

Peptida astfel redusă este hidrolizată complet, amestecul produşilor de reacţie fiind format din α-aminoalcoolul derivat de la C-aminoacid şi aminoacizii liberi componenţi ai restului moleculei:



Peptidă redusă



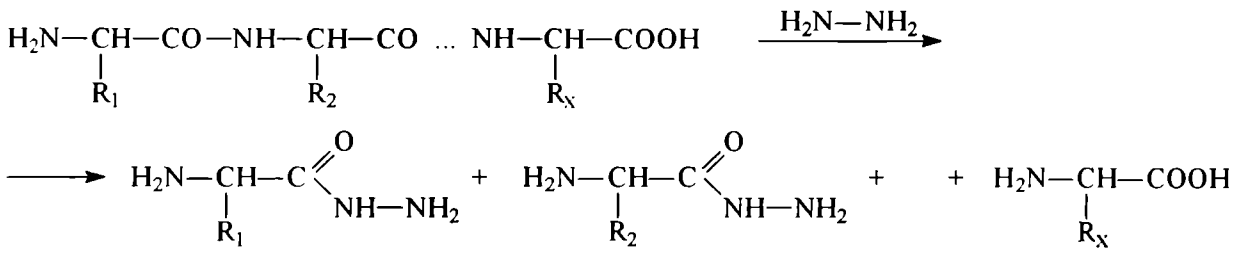
α-Aminoalcool

α-Aminoalcoolul rezultat este identificat şi dozat cromatografic.

B.1.2.2. Metoda Akabori

Reactivul specific utilizat în această metodă este hidrazina anhidră, care scindează lanţul (poli)peptidic, toţi aminoacizii componenţi (cu excepţia C-acidului) fiind transformaţi în hidrazide. Aminoacidul C-terminal se separă în stare liberă şi se poate identifica cromatografic. Reacţia cu hidrazină are loc la 90°C, timp de 20-100 ore, în prezenţa unei răşini schimbătoare de ioni slab acide:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



B.2. Metode biochimice de determinare a structurii primare a peptidelor şi proteinelor

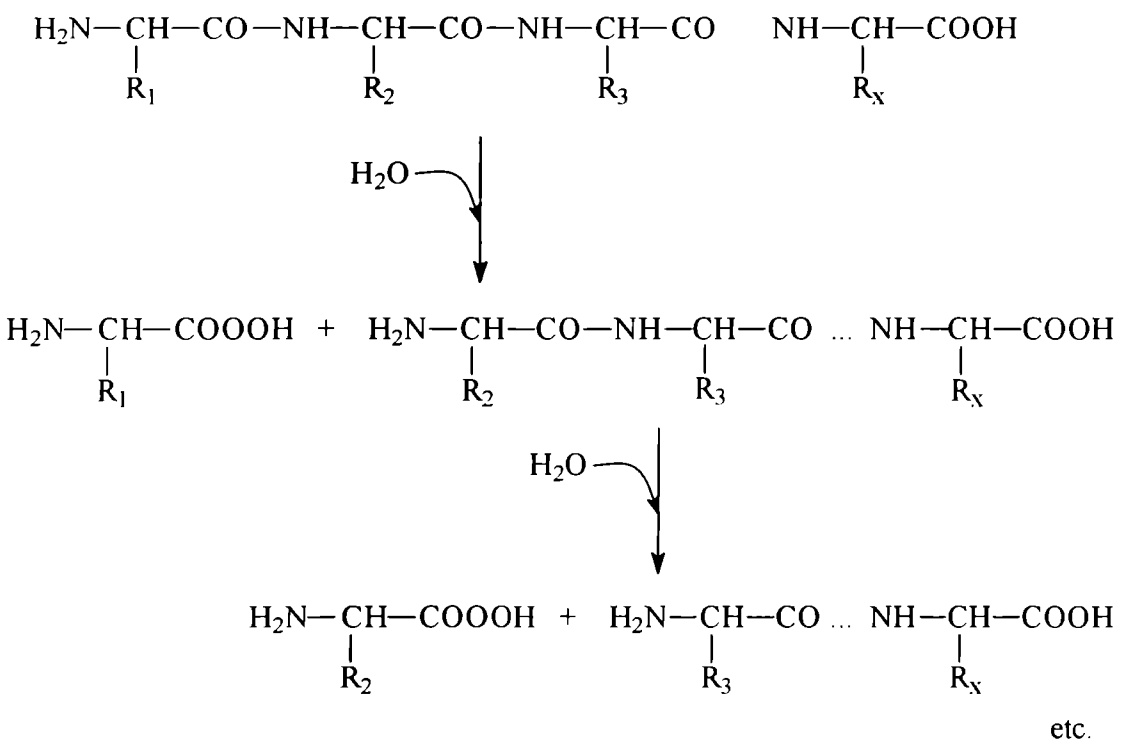
Aceste metode se bazează pe specificitatea de reacţie a unor enzime din clasa hidrolazelor (peptidaze), care pot scinda legăturile amidice ale aminoacizilor din catenele (poli)peptidice. În funcţie de specificitatea lor de substrat, peptidazele pot fi: aminopeptidaze (care scindează legăturile peptidice ale aminoacizilor N-terminali) şi carboxipeptidaze (care hidrolizează legăturile peptidice ale aminoacizilor C-terminali).

B.2.1. Hidroliza cu aminopeptidaze

Din categoria aminopeptidazelor fac parte mai multe tipuri de enzime:

- Leucinaminopeptidaza (aminopeptidază citosolică, peptidază S) se izolează din rinichiul de porc; ea are o stereospecificitate strictă la seria L, dar o slabă specificitate pentru L aminoacizii N-terminali.

Din această cauză, odată aminoacidul N-terminal detaşat, leucinaminopeptidaza continuă să acţioneze asupra capătului N-terminal al peptidei mai scurte formate, hidroliza avansând de-a lungul lanţului moleculei, cu viteză din ce în ce mai mică. Rezultatul este scindarea totală, în trepte, a întregii catene peptidice în L-aminoacizii componenţi:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Datorită acestei caracteristici a leucinaminopeptidazei, enzima este utilizată şi la determinarea secvenței aminoacizilor din catenele peptidelor şi proteinelor, începând de la capătul N-terminal.

De exemplu, dacă leucinaminopeptidaza acționează asupra unei tetrapeptide, în funcție de timpul necesar desprinderii aminoacizilor se poate stabili secvența acestuia (fig. II.2).

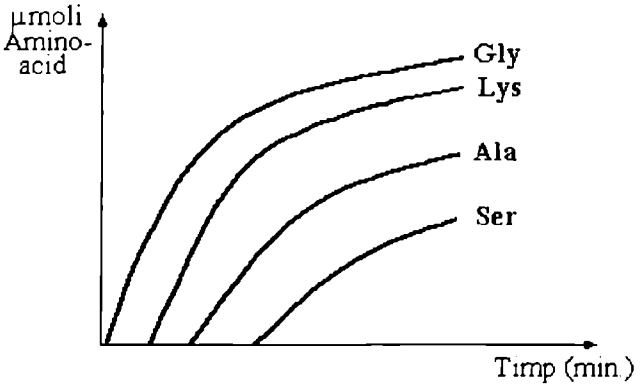


Fig. II.2 Scindarea hidrolitică a tetrapeptidazei Gly-Lys-Ala-Ser cu leucinaminopeptidază

Singura excepție în cazul hidrolizei cu leucinaminopeptidază a fost observată în cazul când aminoacidul N-terminal este prolina; legătura peptidică nu poate fi fragmentată prin această metodă.

- Aminopeptidaza A are o specificitate mai accentuată, enzima hidrolizând legăturile peptidice formate de aminoacizii monoaminodicarboxilici N-terminali (acizii aspartic şi glutamic).

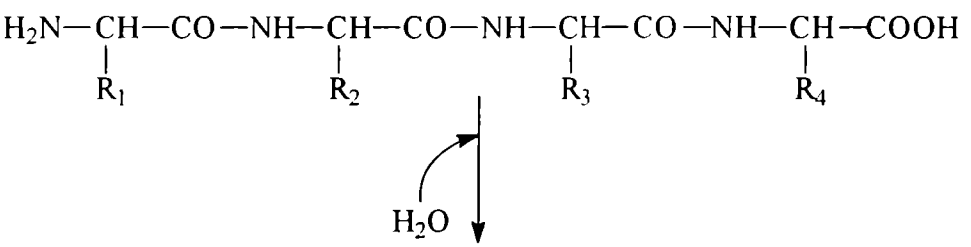
- Aminopeptidaza B hidrolizează legăturile peptidice ale aminoacizilor N-terminali, dacă aceştia au caracter bazic (lisina şi arginina).

B.2.2. Carboxipeptidaze

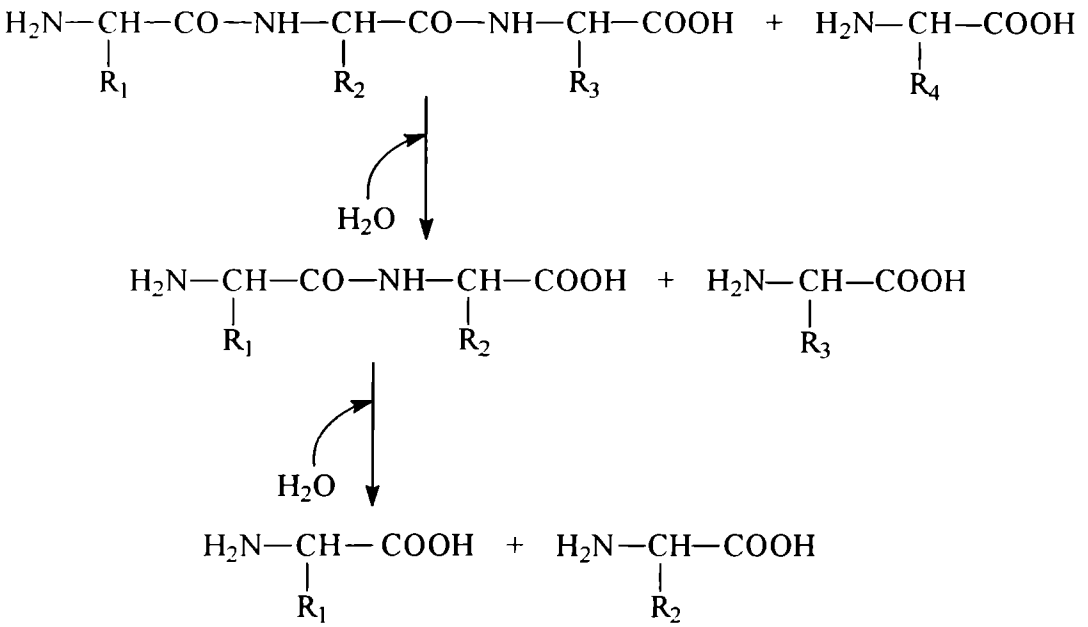
Carboxipeptidazele formează o categorie de enzime hidrolitice care scindează legătura amidică a aminoacizilor C-terminali din moleculele peptidelor şi proteinelor.

- Carboxipeptidaza C din citrice prezintă o slabă specificitate, hidrolizând legăturile peptidice ale tuturor aminoacizilor C-terminali; în cazul glicinei, reacția decurge mai greu.

Datorită slabei sale specificități, carboxipeptidaza C (la fel ca leucinaminopeptidaza) poate fi utilizată şi pentru determinarea secvenței aminoacizilor din catenă, începând de la capătul C-terminal al acesteia:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



- Carboxipeptidaza A din pancreasul de bovină are drept cofactor zincul şi scindează hidrolitic legăturile peptidice ale tuturor aminoacizilor terminali, cu excepția argininei, lisinei, prolinei, ca şi a acizilor care conțin grupe –SH şi $-SO_3H$ libere, precum şi a celor precedați de prolină.

- Carboxipeptidaza B (protominaza) din pancreasul bovin (cu cofactor – zincul) are specificitate pentru legăturile peptidice ale L-lisinei şi L-argininei, dacă aceştia sunt aminoacizi C-terminali.

- Carboxipeptidaza D (sau S_1), catalizează reacția de eliberare a argininei sau lisinei C-terminale, având o specificitate largă şi pH optim = 4,5-6 şi fiind sensibilă la agenții care blochează grupele SH.

- Carboxipeptidaza H (sau E' sau encefalin-convertază), implicată în procesarea prohormonilor, catalizează de asemenea hidroliza peptidil-L-lisinei sau –L-argininei, având drept cofactor zincul.

- Carboxipeptidaza M este o enzimă membranară activă la pH neutru, care catalizează clivarea argininei sau lisinei C-terminale din polipeptide, având cofactor zincul.

Dintre peptid-hidrolazele cu specificitate mai restrânsă, se remarcă chimotripsina, o serin-endopeptidază. La vertebrate, chimotripsinele (A, B, C) se găsesc în sucul pancreatic şi hidrolizează proteinele în intestinul subțire.

Astfel, chimotripsina A şi omologul său, chimotripsina B (de natură bovină sau porcină) hidrolizează peptide, amide şi esteri, de preferință de la capătul C-terminal (resturile de Tyr, Trp, Phe şi Leu).

Chimotripsina C (de asemenea de natură bovină sau porcină) clivează preferențial resturi de Leu, Tyr, Phe, Met, Trp, Glu şi Asn de la capătul C-terminal al peptidelor şi proteinelor.

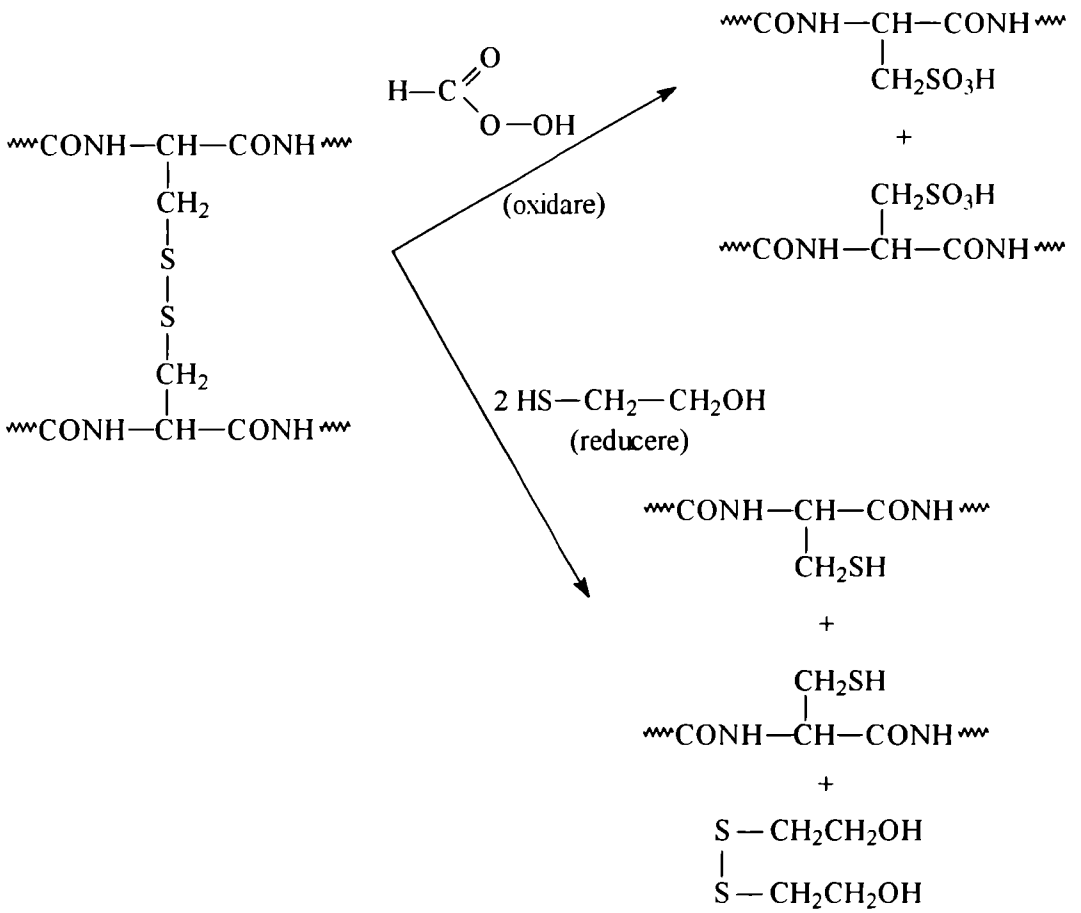
Concluzii definitive asupra structurii primare a peptidelor şi proteinelor se pot trage doar prin corelarea metodelor chimice şi fizice de determinare a acesteia.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

C. Determinarea punților disulfurice din structura primară a peptidelor și proteinelor

Legătura disulfurică poate fi prezentă în structura primară primară a unor peptide (de exemplu în oxitocină) sau în structura terțiară a proteinelor, în care catenele polipetidice pot fi unite între ele prin legături –S – S –.

Evidențierea acestor legături se poate face prin metode oxidative (oxidare cu acid performic) sau reducătoare (cu 2-mercaptoetanol):



II.2.2. Proprietățile fizice ale peptidelor

Peptidele sunt substanțe solide, cristaline, incolore, miscibile cu apa și nemiscibile cu solvenți organici; au puncte de topire ridicate, la care se descompun. În funcție de masa lor moleculară și implicit de raportul dintre partea hidrofobă a moleculei și cea hidrofilă, peptidele se comportă diferit la dispersarea lor în apă. Astfel, dacă oligopeptidele formează cu apa soluții moleculare, polipeptidele, fiind substanțe amfifilice, formează cu apa soluții micelare, concentrația micelară critică fiind diferită de la o polipeptidă la alta (vezi capitolul III).

În ceea ce privește proprietățile lor fizice generale, peptidele se plasează între α-amino-acizi și proteine, având unele comportări asemănătoare cu ambele clase de substanțe.

Activitatea optică a peptidelor depinde de prezența în molecula lor a cel puțin unui rest de α-aminoacid optic activ. În cazul prezenței mai mai multor resturi de aminoacizi optic activi în catenă, activitatea optică a moleculei va fi cu aproximație o funcție aditivă a activităților resturilor respective. Acest lucru este valabil la peptidele cu molecule relativ mici (oligopeptide).

Cu cât lanțul peptidic este mai lung (ca în cazul polipeptidelor, dar și al proteinelor) se observă o activitate optică reală mai mică decât cea aditivă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Proprietățile electrochimice (acido-bazice) ale peptidelor se aseamănă cu cele observate în soluțiile apoase de aminoacizi. Astfel, peptidele cu catenă liniară şi cu grupele $-NH_2$ şi $-COOH$ terminale libere au caracter de amfoliți; curbele lor de titrare, deşi ceva mai complicate, se aseamănă cu cele ale α-aminoacizilor. În soluții apoase, peptidele prezintă mobilitate electroforetică. De asemenea, peptidele prezintă puncte izoelectrice specifice (pH_i sau P_i), la care moleculele se găsesc exclusiv în stare amfiionică, moment în care mobilitatea electroforetică este anulată, iar solubilitatea lor în apă este minimă.

Punctul izoelectric este influențat nu numai de valorile pK_1 şi pK_2 (cu aceeaşi semnificație ca şi la α-aminoacizi), dar şi de valori ale pK_R, dacă lanțul (poli)peptidic conține şi resturi de aminoacizi cu grupe ionizabile în alte poziții decât la atomul C_α. În moleculele peptidelor, cu cât catena este mai lungă, cu atât interacțiile reciproce ale grupelor NH_2 şi COOH terminale sunt mai slabe. În consecință, valorile pK pentru grupa COOH terminală sunt mai mari, iar cele pentru grupa NH_2 terminală – mai mici, în comparație cu grupele similare din α-aminoacizi, aflate la distanță minimă.

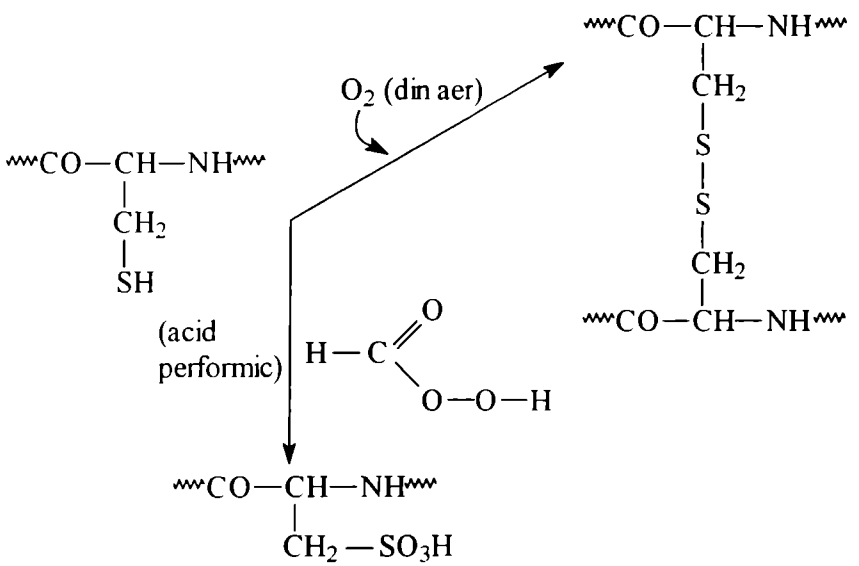
II.2.3. Proprietățile chimice ale peptidelor

Ca şi proprietățile fizice, reacțiile chimice specifice ale peptidelor depind de existența grupelor funcționale şi a resturilor hidrocarbonate din catena (poli)peptidică.

Dintre acestea, unele proprietăți chimice au fost utilizate pentru determinarea structurii lor primare (reacția Sanger, reacția Edman, reacția Hartley, reacția cu acid izocianic, reacția Akabori, reducerea cu borohidrură de litiu).

De asemenea, reacții întâlnite la α-aminoacizi şi datorate prezenței grupelor libere $-NH_2$ (alchilări, acilări, reacția cu acidul azotos) sau grupelor –COOH (esterificări, formări de halogenuri acide, azide etc.) se observă şi în cazul (poli)peptidelor. Prezența grupelor libere OH, provenite de la hidroxiaminoacizii din catenă (Ser, Thr, Tyr) poate fi pusă în evidență prin reacții specifice ale acestora (eterificări, substituții, esterificări).

Grupa sulfhidril (–SH) prezentă în resturile de cisteină, poate fi revelată prin reacții de oxidare blândă (cu formare de legături disulfurice) sau energică (cu formare de acizi sulfonici):

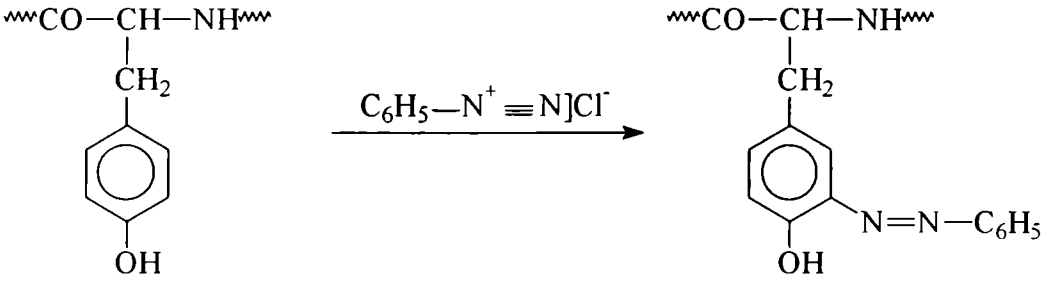


https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În molecula (poli)peptidelor pot exista resturi de aminoacizi aromatici (Phe, Tyr) sau heteroaromatici (Trp, His), prezența ciclurilor putând fi pusă în evidență prin reacții de substituție aromatică electrofilă.

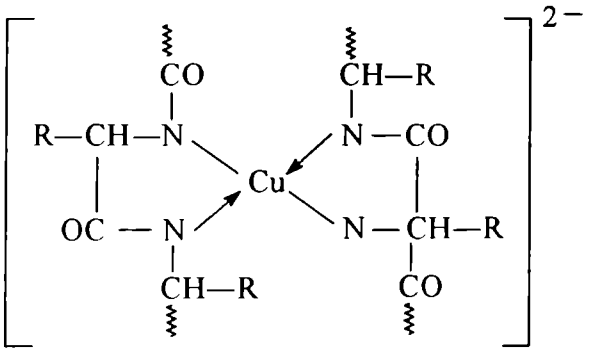
Astfel, la tratarea cu acid azotic concentrat, (poli)peptidele, ca și peoteinele, pot suferi o nitrare în nucleul aromatic, în urma căreia se formează nitroderivați de culoare galbenă (reacția xantoproteică).

De asemenea, resturile de aminoacizi (hetero) aromatici se pot cupla cu săruri de diazoniu, formând derivați azoici colorați; reacția este caracteristică și proteinelor care conțin în moleculă asemenea aminoacizi:



Deoarece sunt formate din resturi de α-aminoacizi, peptidele (ca și proteinele) dau colorații caracteristice (albastru-violet) la tratare cu o soluție alcoolică de ninhidrină.

O reacție comună a proteinelor și a peptidelor (începând de la tripeptide) este reacția biuretului. Reactivul este sulfatul de cupru în soluție alcalină, care colorează proteinele și peptidele în albastru-violet sau violet, ca rezultat al formării unui complex chelat cu ionii Cu^{2+}:



Reacția poate fi considerată caracteristică pentru grupele peptidice prezente în moleculele proteinelor și peptidelor formate din cel puțin trei resturi de aminoacizi.

II.2.4. Peptide naturale

Peptidele prezente în regnurile vii pot fi clasificate în două mari categorii, după proveniența și structura lor, în:

- peptide proteice (provenite de la proteine, prin hidroliza parțială a acestora), formate exclusiv din α-aminoacizi din seria (familia) sterică L;

- peptide neproteice (neconvenționale), prezente în celulele vii, unde au acțiuni biologice diverse, dar care pot fi formate nu numai din L-α-aminoacizi, dar și din D-α-aminoacizi, ca și din β, γ, δ, ε-aminoacizi.

Uneori apar și legături peptidice între aminoacizi și alți acizi carboxilici cu funcțiuni mixte.

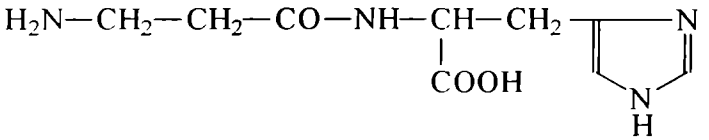
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Peptidele neproteice sunt biosintetizate printr-un mecanism enzimatic diferit de cel al proteinelor, fără participarea ribozomilor sau a ARNm.

În cele ce urmează se vor da câteva exemple de asemenea peptide neproteice, importante prin funcțiile lor biologice.

II.2.4.1. Peptide neproteice izolate din țesuturi animale și vegetale

A. Carnozina (β-Alanil-L-histidina) are în componență un rest de β-aminoacid (β-alanina):

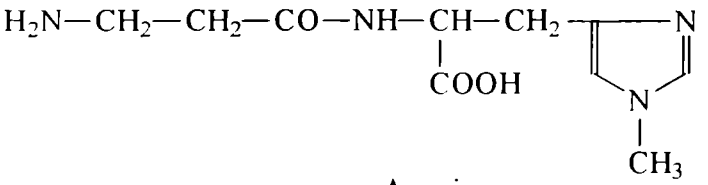


Carnozina se găsește la animale și la om în mușchiul scheletic. Izomerul optic natural, fiziologic activ este L (+) carnozina, solidă, cristalină, care se topește la 245 – 250° cu descompunere.

Carnozina are caracter bazic, este solubilă în apă și formează săruri cu acizii anorganici (clorhidric, azotic). Este scindată hidrolitic de către o metaloenzimă, carnozinaza (din ficat, rinichi, splină), activă în prezența ionilor Zn^{2+} și Mg^{2+}.

Carnozina prezintă proprietăți hipertensive, iar sub formă fosfatată este donor de resturi fosfat, care intervin în contracția musculară.

B. Anserina (β-Alanil-1-metil-L-histidina), izolată inițial din mușchii păsărilor și ulterior din mușchiul scheletic și din creierul unor animale, inclusiv al omului, are o acțiune fiziologică asemănătoare cu cea a carnozinei.



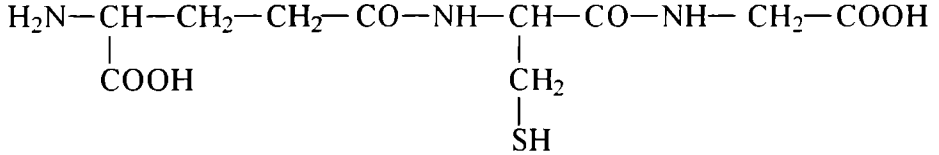
Anserina

S-a demonstrat că biosinteza anserinei include două etape distincte:

- formarea carnozinei și
- metilarea carnozinei.

Acest lucru a fost dovedit prin introducerea în hrana animalelor a carnozinei radiomarcate cu ^{14}C; după un timp s-a în evidență în organismele respective ^{14}C-anserina.

C. Glutationul (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) este o tripetidă prezentă în ambele regnuri vii, în cantități apreciabile.



Glutation

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Izomerul natural al glutationului este levogir ($[\alpha]_D$ = -85°) şi se prezintă ca o substanţă solidă, solubilă în apă şi insolubilă în solvenţi organici, având t.t. = 190 – 192°C (cu descompunere).

Glutationul este prezent în majoritatea organelor plantelor, cu precădere în seminţe, unde se concentrează în perioada de încolţire.

Prezent în toate ţesuturile animale, glutationul se găseşte în cantităţile cele mai mari în ficat (145 – 175mg/100g ţesut), dar şi în: splină (76 – 118), inimă (64 – 69), creier (32) şi muşchi (26).

De asemenea, glutationul este ubicuitar răspândit şi în bacterii.

Acţiunea biologică a glutationului este foarte diversă, unul din rolurile sale esenţiale fiind acela de transportor neezimatic de hidrogen. Aceasta se datorează existenţei grupei tiolice (SH) liberă, foarte sensibilă la agenţii oxidanţi, care transformă glutationul redus în glutation oxidat, reacţia fiind reversibilă:

$$\underset{\text{Glutation redus}}{2\,G-SH} \underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{Glutation oxidat}}{G-S-S-G}$$

Prin aceasta, glutationul poate reduce acidul dehidroascorbic şi joacă rol în protecţia antioxidantă a vitaminei C, a adrenalinei şi a lipidelor din organism.

Alt rol fiziologic al glutationului este cel de agent antioxidant pentru hidroperoxizi şi apa oxigenată, metaboliţi prezenţi în eritrocite, a căror membrană o pot distruge prin oxidare degradativă.

Acest lucru este împiedicat de prezenţa glutationului, care funcţionează ca substrat specific pentru o enzimă cu cofactor de seleniu, glutation-peroxidaza:

$$2\,G-SH + \underset{\substack{\text{Hidroperoxid}\\ \text{organic}}}{R-O-O-H} \xrightarrow{\substack{\text{Glutation-}\\ \text{peroxidază}}} G-S-S-G + ROH + H_2O$$

Glutationul redus este regenerat sub acţiunea glutation-reductazei şi a coenzimei NADPH:

$$G-S-S-G \xrightarrow[NADPH + H^+ \quad NADP^+]{\substack{\text{Glutation-}\\ \text{reductaza}}} 2\,G-SH$$

Printr-un mecanism asemănător are loc şi detoxifierea în cazul apei oxigenate:

$$H_2O_2 + 2\,G-SH \longrightarrow 2H_2O + G-S-S-G$$

Reacţia are loc în prezenţa enzimei glutation: peroxid de hidrogen oxireductaza, glutationul redus jucând rol de coenzimă.

Datorită caracterului nucleofil al grupelor –SH, glutationul se conjugă cu xenobioticele electrofile; rezultă un mecanism de apărare eficient al organismului faţa de unii agenţi chimici toxici (medicamente, substanţe carcinogene).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

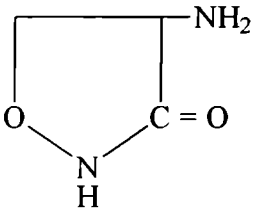
Fiind un reducător intracelular, glutationul contribuie la menținerea grupelor –SH ale enzimelor în stare redusă. Alt rol important al glutationului este acela de participant la transportul aminoacizilor prin mebrana celulară.

De asemenea, glutationul participă în calitate de cofactor în anumite etape ale biosintezei prostaglandinelor (metaboliți implicați în acțiuni vasodilatatoare, vasoconstrictoare, bronhodilatatoare, inflamatorii, în inducerea contracțiilor uterine etc.) şi a leucotrienelor (substanțe active farmacologic, derivate de la acizi graşi polinesaturați, cu funcție de hormoni cu acțiune locală).

II.2.4.2. Peptide neproteice cu acțiune antibiotică

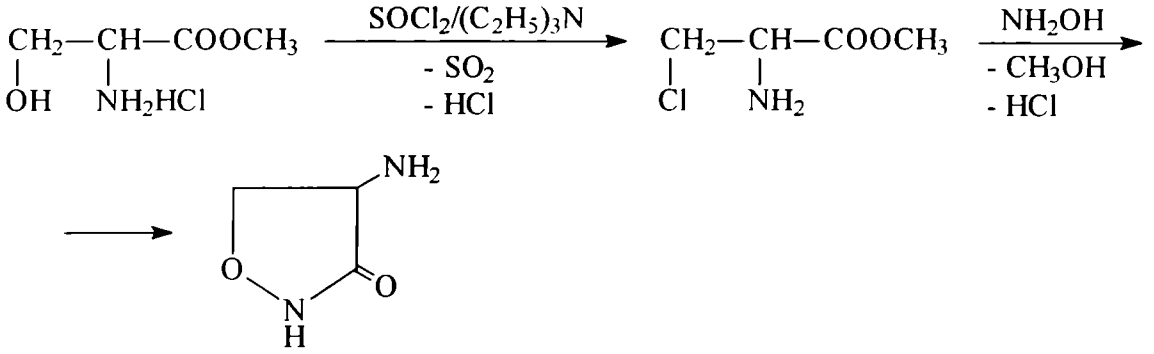
Oligopeptidele ciclice, cu acțiune antibiotică puternică sunt sintetizate de unele microorganisme.

A. Cicloserina (oxamicina, seromicina) este produsă de unele tulpini de *Streptomyces orchidaceus, graphalus, lavendulae*); este o peptidă ciclică, neconvențională:



Cicloserină

Sintetic, se obține din clorhidratul serinatului de metil:



Cicloserina este o substanță solidă, amfoteră, cu t.t. = 156°C; are un spectru antibiotic larg, deşi mai slab decât al altor antibiotice. Se utilizează la tratarea formelor de tuberculoză rezistente la streptomicină, asociată cu alte medicamente tuberculostatice.

De asemenea, în amestec cu penicilina este activă în infecțiile stafilococice. Cicloserina se mai foloseşte în terapia medicală la tratarea leprei şi a infecțiilor urinare rezistente la alte antibiotice.

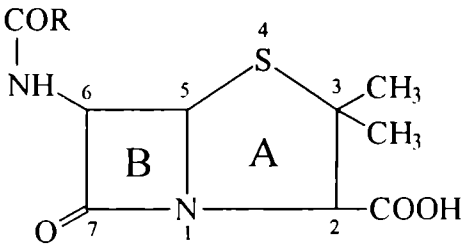
B. Peniciline

Prima penicilină a fost descoperită de către A. Fleming în 1929, dar utilizarea efectivă în terapeutică a inceput în 1943.

Penicilinele reprezintă una dintre clasele cele mai importante de antibiotice, produse de specii de *Penicillium* (*notatum* şi *chrysogenum*).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În structura penicilinelor, scheletul de bază este format din două cicluri condensate: un ciclu β-lactamic (B) şi un ciclu tiazolidinic (A). În poziția 6, penicilinele au şi o funcțiune amidică exociclică:



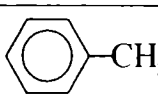
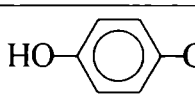
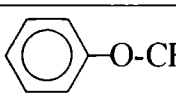
În cazul biosintezei nedirijate, în mediul de cultură al mucegaiurilor se formează un amestec complex de peniciline, care deşi au structuri înrudite, prezintă activități biologice diferite, datorită radicalului R.

Pentru obținerea doar a unui singur tip de penicilină, se alege tulpina de mucegai şi se fac "presiuni" asupra mediului de cultură, în care se introduc precursori ai tipului respectiv.

Astfel, dacă în mediul de cultură se introduc acid fenilacetic sau fenilacetamidă, se obține doar penicilina G (tabelul nr. II.7).

Tabel nr. II.7

Tipuri de peniciline naturale

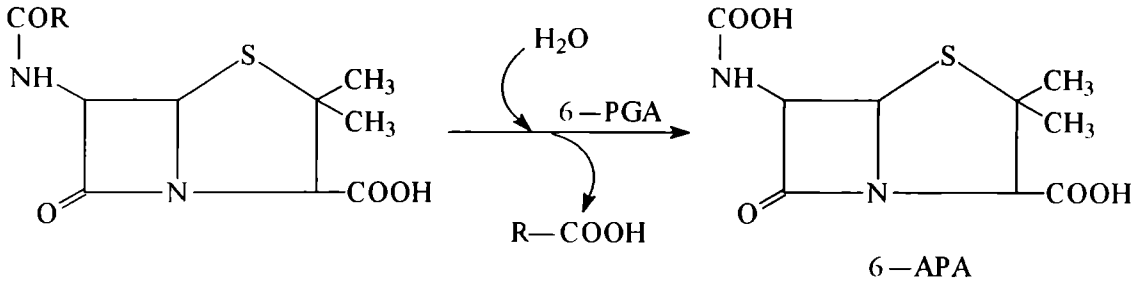
Denumirea penicilinei	Radicalul R		U.I.
	Denumire	Structură	
F	Δ^2-Pentenil	CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-	1500
Dehidro-F (acid gigantic)	n-Amil	CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-	1670
G	Benzil		1667
X	p-Hidroxibenzil		850-900
K	n-Heptil	$CH_3(CH_2)_5$-CH_2-	2300
V	Fenoximetil		1630
O	Alilmercaptometil	CH_2=CH-CH_2-S-CH_2-	1630

De altfel, penicilina G este cel mai des utilizată în practica medicală, datorită accesibilității sale, a stabilității şi a acțiunii sale antibiotice.

Penicilinele au acțiune bacteriostatică şi bactericidă, în special asupra germenilor Gram-pozitivi. Această acțiune se explică prin faptul că aceste antibiotice împiedică formarea membranelor celulare ale bacteriilor, care pot fi astfel distruse cu uşurință. Gama acestor antibiotice a fost extinsă prin obținerea penicilinelor de semisinteză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În acest scop, penicilina naturală (G sau V) este supusă hidrolizei fermentative, cu 6-penicilin-acilaza (6-PGA), cu obținere de acid 6-aminoparicilanic (6-APA).



6—APA

Ca surse de PGA se utilizează celule de *Escherichia coli* (pentru obținerea 6-APA din penicilina G) sau de *Bovista plumbei* (pentru obținerea 6-APA din penicilina V).

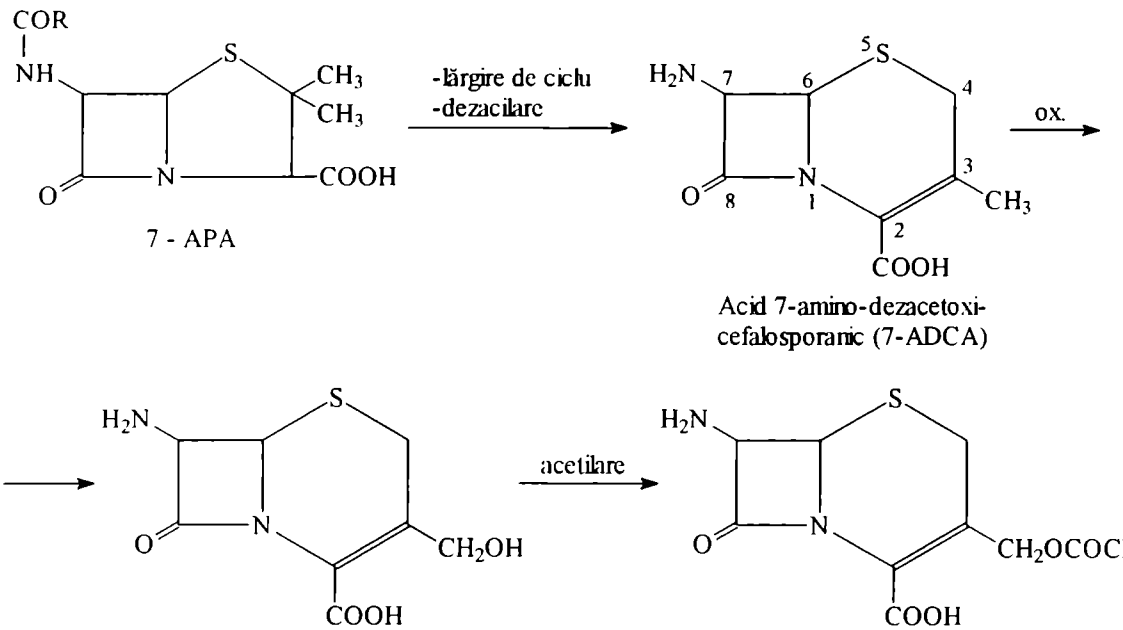
După izolarea și purificarea 6-APA, urmează N-acilarea grupei NH_2 din poziția 6 cu diverse grupe acil, în prezența PGA.

C. Cefalosporine

Ca precursori pentru obținerea pe cale chimică sau fermentativă a cefalosporinelor se utilizează penicilinele naturale, în scopul lărgirii ciclului de cinci atomi (tiazolidinic) din structura penicilinelor la ciclul de șase atomi (dihidrotiazinic), urmată de dezacilarea grupei NH_2 din ciclul β-lactamic.

Se obține inițial acidul 7-amino-dezacetoxi-cefalosporanic (7-ADCA), intermediar în formarea acidului 7-aminocefalosporanic (7-ACA).

7-ACA este supus apoi acilării, cu obținere de cefalosporine de semisinteză:



7 - APA

Acid 7-amino-dezacetoxi-cefalosporanic (7-ADCA)

Acid dezacetil-7-aminocefalosporanic

Acid 7-amino-cefalosporanic (7-ACA)

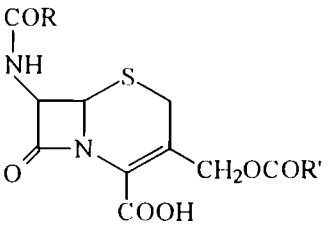
Pentru aceste transformări se preferă metoda enzimatică, deoarece metodele chimice necesită protejarea grupelor reactive.

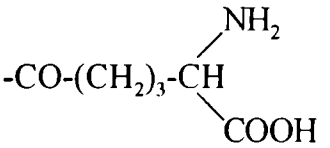
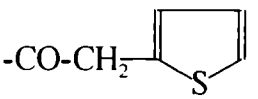
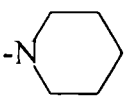
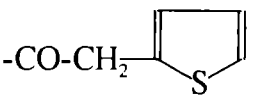
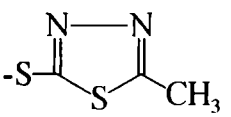
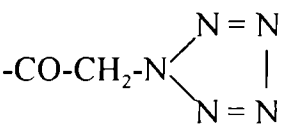
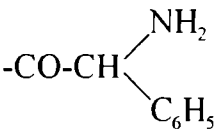
Cefalosporinele au un spectru antibiotic mai larg decât penicilinele, fiind active atât asupra germenilor Gram-pozitivi cât și Gram-negativi.

În tabelul nr. II.8 sunt date câteva exemple de cefalosporine de semisinteză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. II.8

Cefalosporine de semisinteză de forma 

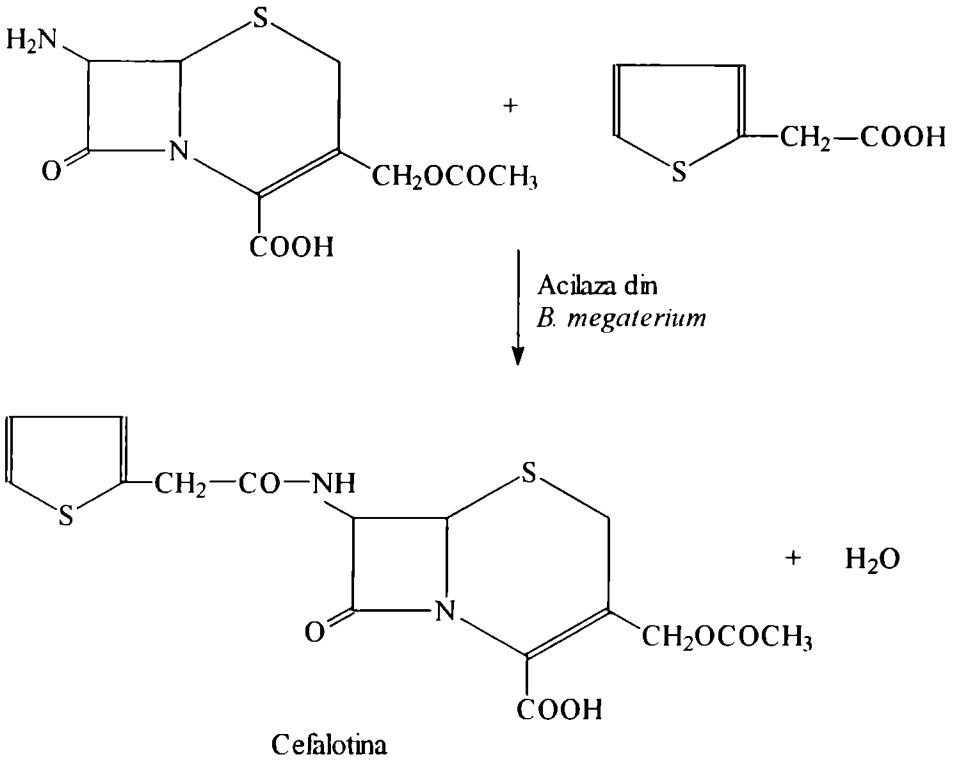
Denumirea cefalosporinei	R'=	R=
Cefalosporina C	-$OCOCH_3$	
Cefalotina	-$OCOCH_3$	
Cefacetil	-$OCOCH_3$	-$CO-CH_2-CN$
Cefalolisina		
Cefazolina		
Cefalexina	-H	

La ora actuală, s-a ajuns la a treia generație de cefalosporine, toate derivate de la 7-ADCA, lărgindu-se mult spectrul acțiunii lor antibiotice. De exemplu, cefalotina şi cefazolina, reprezentante ale primei generații (numite şi "cefalosporine de bază") au acțiuni sensibil diferite:

- cefalotina este activă față de bacterii Gram-pozitive (cu excepția enterococului) şi Gram-negative (*E. coli, Proteus mirabilis, Klebsiela*) anaerobe;
- cefazolina are o acțiune mai puternică decât cefalotina asupra bacteriilor Gram-negative.

Semisinteza cefalosporinelor se face pe cale fermentativă; astfel, cefalotina se obține industrial din acid 7-aminocefalosporanic şi acid 2-tiofenacetic, în prezența acilazei din *Bacillus megaterium*:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

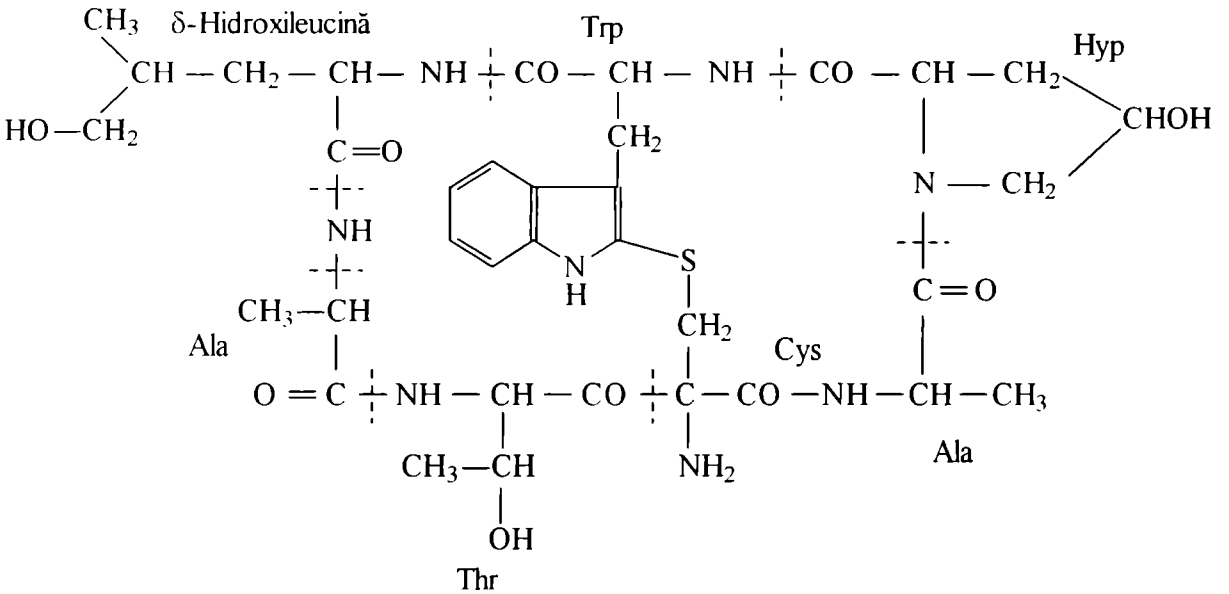


Cefalotina

II.2.4.3. Peptide toxice

În ciuperca *Amanita phalloides* se găsesc două oligopeptide ciclice, a căror acțiune toxică intervine în blocarea biosintezei proteinelor specifice animalelor.

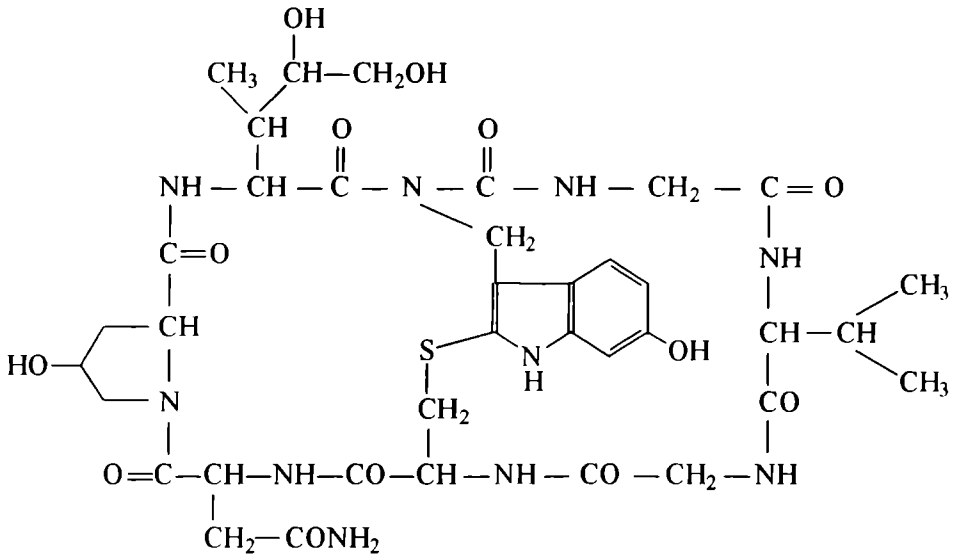
A. Faloidina este o heptapeptidă biciclică, având în structură resturi de: treonină, cisteină, L-hidroxitriptofan, alanină, δ-hidroxileucină și hidroxiprolină:



Faloidina este solidă, cristalină, cu masa moleculară = 0,77 kDa și t.t. = 280-282°C.

B. Amanitina are o structură de octapeptidă biciclică:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



După cum se poate observa, în structura acestei peptide intră şi unii aminoacizi neconvenționali.

Acțiunea toxică a α-amanitinei constă în blocarea formării precursorilor de ARNm şi a ARN polimerazei II, implicați în procesul de biosinteză a proteinelor specifice.

II.3. Proteine

Proteinele reprezintă o clasă de biomolecule informaționale, componente de bază ale organizării, structurării şi specializării organismelor vii.

Macromoleculele proteinelor sunt formate din una sau mai multe catene polipeptidice, constituite, la rândul lor, din resturi de aminoacizi legate prin legături peptidice, a căror secvență rezultă din traducerea mesajului genetic al ADN-ului, transmis prin intermediul ARN mesager (ARNm) la nivelul ribozomilor.

Lanțurile polipeptidice ale proteinelor pot conține de la 100 până la peste 1000 resturi de aminoacizi.

Dintre toate categoriile de biomolecule, proteinele prezintă cea mai mare diversitate de funcții biologice: proteine structurale (care asigură coeziunea şi integritatea celulelor), enzime (biocatalizatori indispensabili reacțiilor metabolice), mesageri chimici, hormoni etc.

"Moleculele proprii" de proteine, situate pe membrane, reprezintă un fel de carnet de identitate biologică.

Începând de la nivelul subcelular, proteinele participă la formarea celulelor, țesuturilor şi organelor materiei vii.

Compoziția elementară a proteinelor relevă prezența în toate cazurile a elementelor: C, H, O şi N, şi într-o mai mică măsură, a S, P, precum şi a unor microelemente (Fe, Cu, Ca, Mg, Mn, Zn etc.).

Conținutul în proteine variază nu numai de la o specie la alta, dar, în cadrul aceluiaşi organism – de la un organ la altul, de la țesut la țesut. Astfel, dacă în dinți proteinele se găsesc în proporție de ~ 0,1%, ele pot atinge proporția de 34,7% în mușchi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

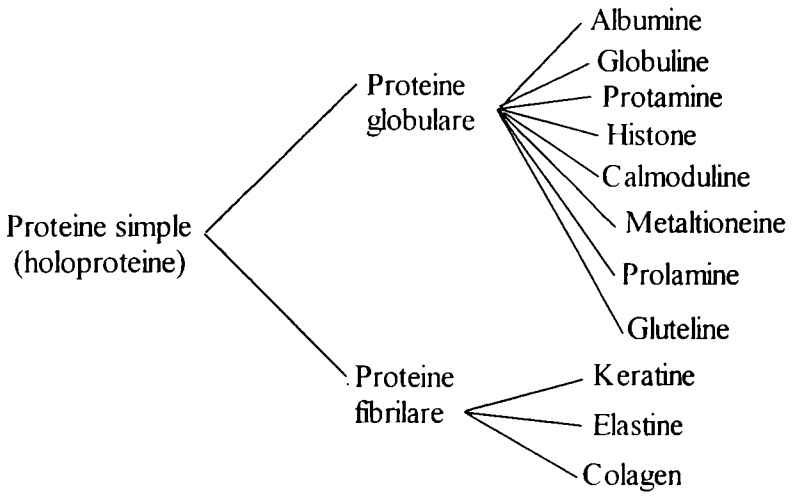
II.3.1. Clasificare

Proteinele se clasifică în funcție de două criterii principale:

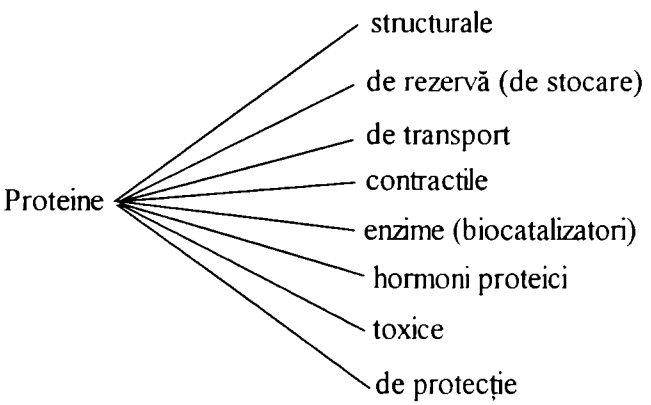
- criteriul chimic și
- criteriul biologic.

A. După criteriul chimic, proteinele se clasifică în: proteine simple (holoproteine), care la hidroliză conduc numai la aminoacizi și proteine conjugate (heteroproteine), formate din două părți: o proteină (apoproteină) și o grupă prostetică (substanță neproteică) legată covalent sau necovalent de apoproteină.

Dacă în cazul holoproteinelor criteriul de subclasificare îl reprezintă solubilitatea (proteine globulare și fibrilare), heteroproteinele se diferențiază după natura grupei prostetice (acid fosforic, acizi nucleici, glucide, lipide, metale etc.):



B. Criteriul biolgic al clasificării proteinelor ține de funcția sa biologică:



II.3.2. Structura proteinelor

Din cei peste 200 aminoacizi întâlniți în natură, cei 20 aminoacizi naturali, standardizați intră în componența proteinelor.

Deși funcția principală a lantului este grupa peptidică (amidică) întâlnită atât în peptide cât și în proteine, la cele din urmă, datorită lungimii mari a lanțurilor polipeptidice apar pe lângă structura primară și forme superioare de organizare (structura secundară, terțiară și cuaternară).

Structurile: secundară, terțiară și cuaternară ale proteinelor mai sunt cunoscute și sub termenul de "conformație spațială", deosebit de importantă pentru specificitatea și rolul biologic al proteinelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.3.2.1. Structura primară

Structura primară a proteinelor, constând în natura aminoacizilor componenți și raportul cantitativ dintre aceștia, ca și în succesiunea (secvența) lor în catena liniară are aceeași semnificație ca și în cazul peptidelor, iar metodele de determinare sunt asemănătoare.

Numărul imens de proteine diferite izolate din organismele vii (10^{10} – 10^{12}) se datorează acestei structuri primare, formată în principal din resturile celor 20 de aminoacizi naturali "standardizați".

Secvența aminoacizilor din lanțurile polipeptidice ale proteinelor este controlată genetic, conform codului genetic al speciei respective, transmis pe ARNm și utilizat la biosinteza proteinelor specifice la nivel de ribozomi. Deci secvența proteinelor naturale este stabilită genetic, având caracter ereditar.

Ca și în cazul peptidelor, în moleculele proteinelor structura anticoplanară (transoidă) a grupelor peptidice și posibilitatea rotirii libere a atomilor de C_α sunt elemente de prim ordin (fig. II.3).

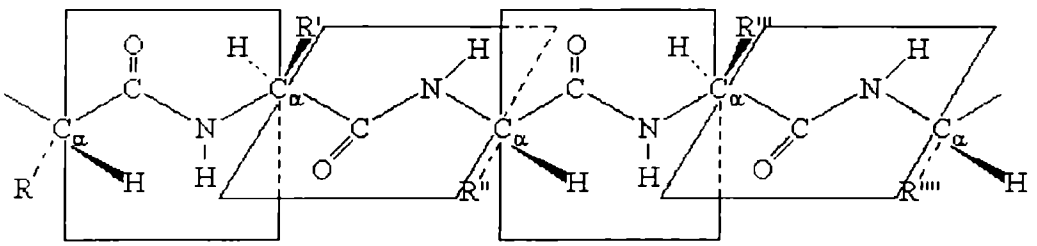


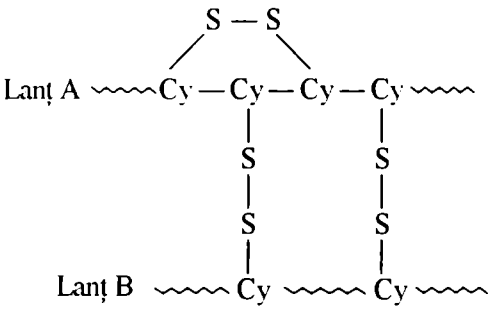
Fig. II.3 Fragment din structura primară a unei catene (poli)peptidice

În afară de glicină, toți ceilalți aminoacizi naturali standardizați din componența proteinelor naturale sunt optic activi și aparțin familiei (seriei) sterice L.

Modificări apărute în structura chimică sau în secvența aminoacizilor din componența proteinelor, determinate de agenți chimici, fizici (radiații) sau de mutații genetice (variații ereditare accidenatale cauzate de modificarea programului genetic purtate de o moleculă de ADN) au drept consecință biosinteza unor proteine modificate, anormale.

Metodele de determinare a structurii primare a proteinelor sunt identice cu cele utilizate la peptide și descrise în cap. II.2.

Numeroase proteine conțin mai multe catene polipeptidice, menținute împreună prin legături transversale. Legături disulfurice între resturile de cisteină pot releva două lanțuri sau chiar două părți îndepărtate ale aceluiași lanț. De exemplu, insulina bovină conține un lanț A format din 21 aminoacizi, legat prin intermediul a două legături disulfurice de un lanț B, format din 30 aminoacizi; se formează astfel o proteină ciclică:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.3.2.2. Structura secundară a proteinelor

Din cele expuse până acum, s-a luat în considerație doar caracterizarea polipeptidelor în funcție de lanțurile liniare de aminoacizi, adică din punctul de vedere al structurii lor primare.

Un factor la fel de important este însă modul în care aceste lanțuri sunt dispuse în spațiul tridimensional. Astfel, faptul de a cunoaşte că un anume aminoacid din catena laterală a unei enzime intervine in catalizarea unei reacții, nu ne dă nici o relație asupra detaliilor acestei intervenții. Concret, nu se poate şti dacă aminoacidul participă la formarea unei legături între enzimă şi substrat, sau dacă el este pur şi simplu indispensabil pentru menținerea aranjamentului steric particular al moleculei enzimei, grație interacției cu lanțurile laterale ale altor aminoacizi din compoziția enzimei.

Aceste considerații necesită cunoaşterea organizării (conformației) spațiale a proteinelor, obiectul unor cercetări intensive de laborator.

O tehnică de foarte mare valoare în studiul structurii tridimensionale a proteinelor este cristalografia cu raze X.

Prin studiul cu raze X al structurii aminoacizilor şi peptidelor, s-a arătat că grupa amidă din lanțul (poli)peptidic are o structură anticoplanară şi s-a măsurat lungimea legăturilor şi mărimea unghiurilor unei unități a lanțului.

Această particularitate a grupei amidice, studiată cu raze X, a permis elucidarea celor două tipuri principale ale structurii secundare a proteinelor: structura secundară α-helix şi structura secundară β (de foaie pliată).

A. Structura secundară α

În fig. II.4 este reprezentată structura secundară α-helix de dreapta a proteinelor naturale; acest tip de chiralitate helicoidală apare datorită faptului că aceste proteine sunt formate din L-aminoacizi.

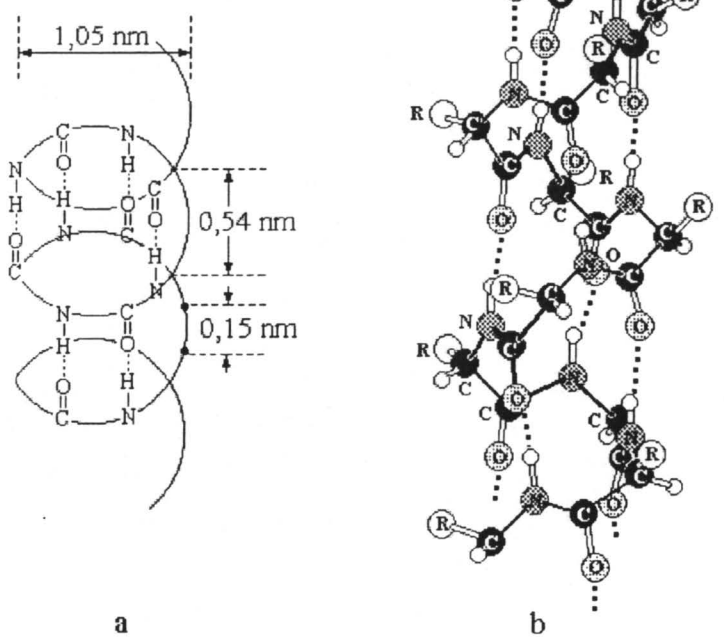


Fig. II.4 Reprezentarea structurii secundare α a proteinelor

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Existența structurii α-helix de dreapta în proteinele naturale a fost descoperită de Pauling și Corey, prin difracția cu raze X, aplicată la α-keratină, o proteină fibrilară din lână și păr.

Caracteristicile principale ale acestei structuri sunt următoarele (fig.II.4 a):

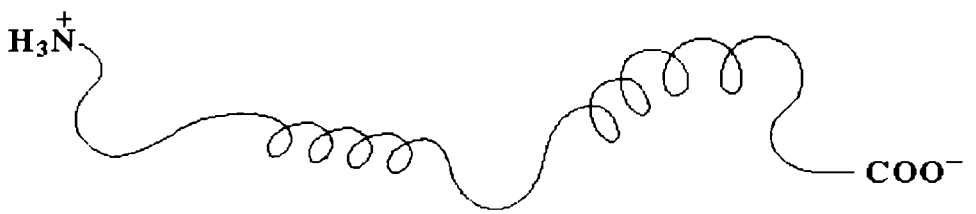
- o spiră completă conține 3,6 resturi de L-aminoacizi;
- distanța dintre două spire (pasul elicei) este de 0,54 nm;
- înălțimea cu care contribuie fiecare rest de aminoacid la lungimea α-helixului pe direcția axului central este de 0,15 nm (0,54:3,6);
- într-o serie de 5 spire complete, care cuprind 18 resturi de aminoacizi (5 x 3,6 = 18), se întâlnește un rest de aminoacid într-o poziție similară cu primul aminoacid luat ca punct de referință, adică după 2,7 nm, care reprezintă "perioada de identitate" (18 X 0,15 = 2,7);
- diametrul unei spire este de 1,05 nm;
- grupele $\rangle C = O$ și –NH provenite din două grupe peptidice situate într-o poziție sterică avantajoasă pe două spire vecine, formează legături de hidrogen paralele cu axul central, longitudinal, al helixului. Aceste legături sunt slabe, dar numărul lor mare conferă stabilitatea aranjamentului α-helix;
- radicalii R legați de atomii de C_α ai aminoacizilor sunt orientați radial, spre exteriorul α-helixului, de o parte și de alta a planurilor legăturilor peptidice, formând o a doua zonă helicoidală, exterioară.

Structura secundară α-helix poate apărea sub forma unor bastoane (fibre) mai scurte sau mai lungi, cu lungimea de 4 – 100 nm (și chiar mai mult).

Exemple de proteine cu structură secundară α sunt α-keratinele din păr (cu 7 fibre) și din lână (cu trei fibre). Fibrele sunt asociate între ele prin punți disulfurice, formând structuri superhelicoidale cu rol important în proprietățile fizico-mecanice ale proteinelor .

Structuri α-helix apar și în cazul altor proteine: epidermina din piele, miozina și tropomiozina din mușchi, fibrina din cheagul de sânge.

Se observă însă existența unui număr relativ mic de proteine cu procent maxim de spiralare. În cele mai multe cazuri, catenele polipeptidice ale proteinelor sunt formate din porțiuni spiralate, organizate, întrerupte de segmente dezorganizate, randomizate:



Acest aranjament discontinuu a fost pus în evidență la mioglobină (Kendrew și Perutz, 1950). Segmentele nespiralate sunt determinate de prezența în lanț a unor resturi de aminoacizi helix deformatori (prolina, hidroxiprolinele) sau helix destabilizatori (Ser, Ile, Thr, Glu, Asp, Lys, Arg, Gly).

Asemenea structuri dezorganizate apar în cazul proteinelor globulare, cu grad de spiralare specific.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se observă că α-helixul este destabilizat de aminoacizii cu radicalul R foarte mic (Gly) şi de cei polari (Asp, Glu, Lys) disociaţi la pH = 7.

Prolina şi hidroxiprolinele sunt aminoacizi deformatori ai α-helixului, deoarece rigiditatea ciclului pirolidinic împiedică plierea lor sub formă helicoidală.

B. Structura secundară β

În 1951, Pauling şi Corey au postulat structura β, în planuri pliate, aranjament stabilizat printr-un mare număr de legături de hidrogen intercatenare.

Dacă structura α-helix implică o singură catenă polipeptidică spiralată, structura secundară β este formată din cel puţin două catene polipeptidice asociate paralel (fig. II.5a) sau antiparalel (fig. II.5b) prin legături de hidrogen intracatenare între grupele $\rangle C = O$ şi $\rangle NH$ ale lanţurilor polipeptidice.

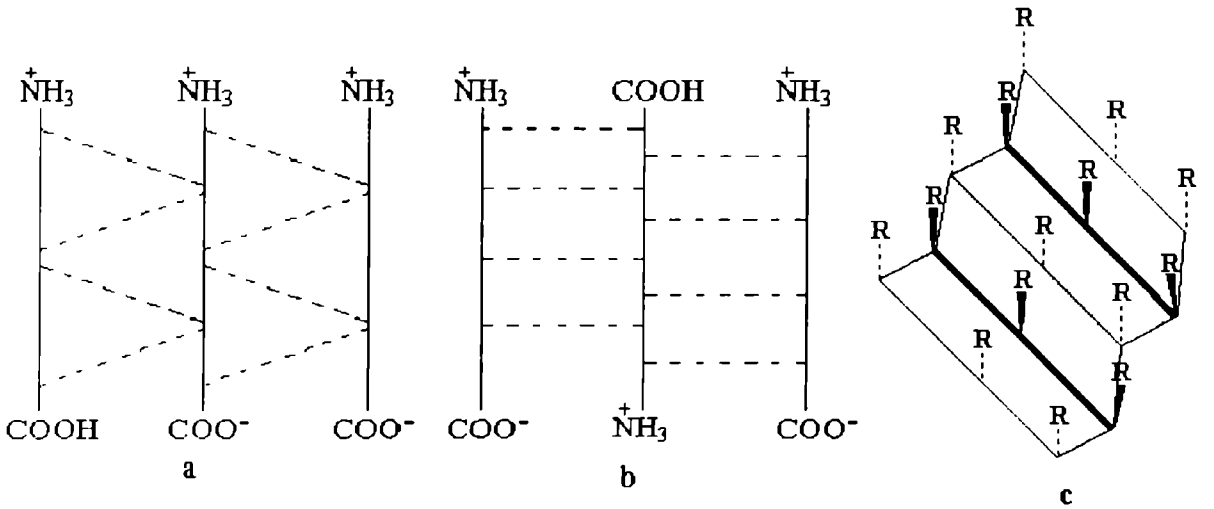


Fig. II.5 Aranjamentul catenelor polipeptidice în cazul structurii secundare β a proteinelor

Asemenea structură în "foaie pliată" se întâlneşte la proteinele fibrilare ca β-keratina din păr (obţinută din firul de păr înmuiat în soluţii alcaline calde şi supus întinderii) care prezintă o orientare paralelă a catenelor polipeptidice şi la fibroina din mătase naturală, cu orientare antiparalelă a lanţurilor.

Structura secundară β se mai poate observa la proteinele fibroase din pene şi din lână.

Planelor grupelor peptidice se intersectează formând muchiile pe care se află atomii de C_α, ai căror radicali R sunt orientaţi deasupra şi dedesubtul planurilor, transoid, repetitiv, în zig-zag, de-a lungul axului catenar longitudinal. Legăturile de hidrogen intercatenare sunt dispuse aproape perpendicular pe axul catenelor polipeptidice (fig. II.5c).

Aranjamentul spaţial al structurii secundare β este mai destins (deci mai puţin stabil) decât cel al structurii secundare α-helix. Acest lucru poate poate fi demonstrat pe baza unor observaţii practice. Astfel, ţinută la umezeală şi căldură, α-keratina din lână se poate întinde până la o lungime dublă, prin ruperea legăturilor de hidrogen intracatenare din α-helixul de dreapta. Este favorizată trecerea la structura β, mai destinsă, cu legături de hidrogen intercatenare.

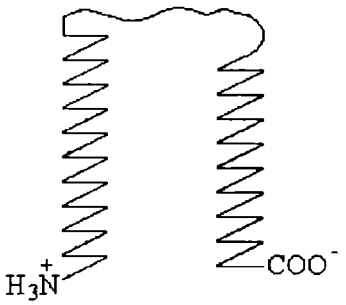
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Transformarea este însă reversibilă, structura de foaie pliată, mai puțin stabilă, trecând spontan în structură α-helix.

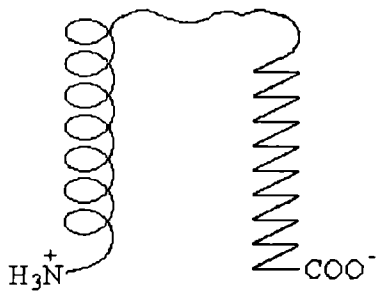
α-Keratină ⟷ β-Keratină

În general, β-keratinele sunt bogate în aminoacizi cu radicali R mici (Gly, Ala).

Se observă însă că, la fel ca structura α-helix, nici structura β de "foaie pliată" nu este total preponderentă în moleculele proteinelor, porțiunile regulate ale moleculelor fiind întrerupte de regiuni dezorganizate, randomizate, ca în cazul concanavalinei A din fasole:



Mai mult decât atât, există şi proteine care conțin ambele tipuri de structură secundară (α şi β), ca anhidraza carbonică umană, carboxipeptidaza şi triozofosfat izomeraza:



C. Structura secundară a colagenului

Colagenul, proteina cu cea mai mare răspândire la vertebrate, este o proteină extracelulară, organizată sub formă de fibre insolubile, foarte elastice. Colagenul este prezent aproape în orice țesut animal, dar mai ales în oase, cartilagii, tendoane, ligamente, piele şi în vasele sanguine.

Structural, colagenul este compus din: 35% glicină, 11% α-alanină, 12% prolină şi 9% 4-hidroxiprolină (Hyp), pe lângă cantități mici de 5-hidroxilisină (Hyl) şi 3-hidroxiprolină.

Determinări cu compuşi radiomarcați au arătat că hidroxiaminoacizii nu sunt incorporați în lanțul polipeptidic rezultat la biosinteza colagenului. Astfel, dacă şobolanii sunt tratați cu Hyp cu ^{14}C, colagenul sintetizat de aceştia nu este radioactiv. În schimb, administrarea de Pro cu ^{14}C conduce la colagen radioactiv. Acest lucru demonstrează că Hyp se formează ulterior biosintezei lanțului polipeptidic, prin hidroxilarea resturilor de prolină. Hidroxilarea este catalizată de prolilhidroxilază, enzimă dependentă de prezența vitaminei C.

Hyp conferă stabilitate colagenului, probabil datorită fromării unor legături de hidrogen, inclusiv cu moleculele de apă. Acest din urmă fenomen explică şi caracterul puternic hidrofil al colagenului, care se îmbibă cu apă, mărindu-şi volumul. Îmbibarea este reversibilă, volumul proteinei revenind la normal prin uscare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Studii cu raze X au arătat că molecula colagenului este formată din trei lanțuri polipeptidice helicoidale, paralele și ușor răsucite, care formează o structură superhelicoidală de triplu helix (fig. II. 6), numit tropocolagen.

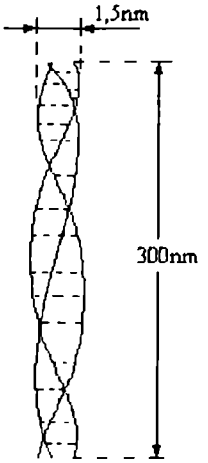


Fig. II.6 Structura tropocolagenului

Fiecare catenă polipeptidică din tropocolagen este răsucită în spirală spre stânga, în jurul axei sale și, în același timp, răsucită spre dreapta în jurul unui ax comun. Superhelixul rezultat are pasul de 2,86 nm, catenele polipeptidice fiind strâns unite prin legături de hidrogen intercatenare, perpendiculare pe axa lungă a triplului helix.

Fiecare catenă polipeptidică are o masă moleculară de 95 kDa și este o elice de dreapta, formată din 1000 resturi de aminoacizi. Fiecare spiră conține 3,3 resturi de aminoacizi și are o înălțime de 1nm. Distanța dintre doi aminoacizi pe direcția axei lungi este de 0,286 nm. Punctele de intersecție ale triplului helix conțin resturile de glicină din cele trei catene polipeptidice.

Această structură de triplu helix este responsabilă de elasticitatea colagenului, ușor elongabil și suportând cu ușurință acțiunea unor forțe laterale de compresiune.

Micrografia electronică a relevat că aceste triplu-helixuri de tropocolagen sunt organizate sub formă de fibrile asamblate în "pachete". Fibrilele de colagen sunt insolubile în solvenți capabili de a rupe legăturile de hidrogen și ionice intercatenare, ceea ce a dus la concluzia existenței și a unor legături covalente, printr-o reticulare intra- și intermoleculară între fibrilele de tropocolagen (fig. II.7).

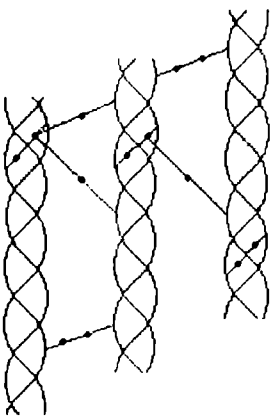


Fig. II.7 Reticularea intra- și intermoleculară din fibrilele de tropocolagen

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cum în lanțurile polipeptidice ale colagenului nu există resturi de cisteină capabile de a forma punți disulfurice, s-a demonstrat existența unor legături covalente apărute între resturile de lisină și de histidină, sub influența unor enzime. Reticularea implică de asemenea și extremitățile N-terminale și C-terminale din lanțurile polipeptidice.

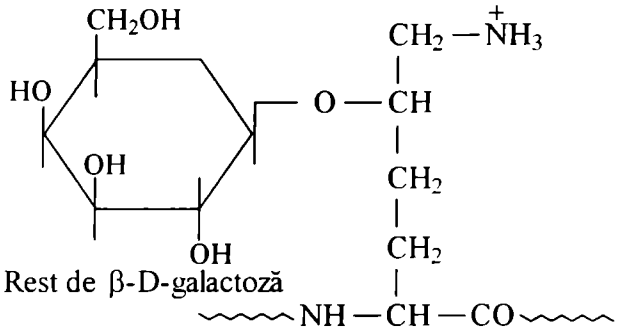
Lungimea și tipul legăturilor covalente încrucișate depind de starea fiziologică și de vârsta țesutului animal. Astfel, gradul de reticulare crește cu vârsta animalelor, ceea ce explică de ce carnea animalelor bătrâne fierbe mai greu. De asemenea, tropocolagenul a fost izolat numai din țesuturile animalelor tinere.

În țesuturi diferite, fibrilele de colagen pot fi organizate specific. Astfel, în tendoane ele se orientează sub formă de mănunchiuri paralele; în piele sunt stratificate sub formă de foi de fibrile, sub diferite unghiuri; în cartilagii există un aranjament nedistinctibil etc.

Perturbări în structura colagenului pot declanșa o serie de boli. Înlocuirea unui aminoacid cu altul în secvența lanțului polipeptidic duce la ruperea triplului helix sau la suprimarea unui fragment polipeptidic. În consecință, pot apărea dereglări ca: hiperextensibilitatea pielii și articulațiilor (de care suferea N. Paganini), fragilitatea oaselor și boli degerenative (osteoartrite, plăci aterosclerotice fibroase din arterele umane etc.).

Colagenul conține și glucide (în proporție de 0,4 – 0,12% în greutate), mai ales glucoză, galactoză și diglucide ale acestora.

Resturile glucidice sunt legate enzimatic prin legături β-glicozidice de resturile de hidroxilisină din catenele polipeptidice:



Rest de β-D-galactoză

Rest de 4-hidroxilisină (Hyl)

Biosinteza colagenului are loc în fibroblaste, în două faze principale: intra- și extracelulară.

În timp ce colagenul din oase și piele este metabolic stabil, cel din ficat are o rată ridicată de metabolizare.

Colagenul este clivat hidrolitic de colagenaze, proteinaze dintre care cea mai importantă este de origine microbiană (din *Clostridium hidroliticum*), numită și colagenaza A.

D. Structura elastinei

Elastina este o proteină cu proprietăți elastice asemănătoare cauciucului, ale cărei fibre, supuse elongării, pot reveni ușor la lungimea lor inițială după încetarea acțiunii forțelor de deformare. Elastina este componenta principală a țesuturilor galbene conjunctive din vasele sanguine largi, ca aorta și a țesutului pulmonar. Țesuturile neelastice conjunctive albe din tendoane conțin cantități mici de elastină.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În structura sa primară, elastina conține o treime resturi de glicină, o treime alanină și valină, prolină și cantități mici de lisină.

Elastina formează o rețea tridimensională de fibre care nu prezintă o periodicitate caracteristică în microscopia electronică. Rețeaua se realizează prin legături încrucișate la care participă lisina din lanțurile polipeptidice.

Elastina matură este insolubilă în apă și este biosintetizată de către fibroblaști, sub formă de tropoelastină (monomer solubil). Elasticitatea și extensibilitatea se datorează ordonării la întindere a structurii dezordonate a lanțurilor și existenței unor legături încrucișate între lanțuri, care permit revenirea la forma inițială.

Structura secundară neregulată a fibrelor de elastină a fost dovedită prin analiza cristalografică cu raze X.

Reticularea covalentă intermoleculară a lanțurilor polipeptidice este de asemenea responsabilă și de insolubilitatea elastinei.

Elastina este hidrolizată de elastaze, proteinaze cu specificitate variată (de natură pancreatică și leucocitară).

II.3.2.3. Structura terțiară a proteinelor

Structura terțiară este un nivel superior de organizare tridimensională adoptată de macromoleculele proteice, în funcție de structura primară și secundară a acestora. Porțiunile randomizate care întrerup structura secundară organizată, α sau β, a proteinelor au o anumită flexibilitate.

În funcție de interacțiile care pot apărea între radicalii R ai resturilor de aminoacizi din aceste porțiuni, catena proteică va fi forțată să adopte o conformație specifică, dirijată genetic.

Legăturile care intervin astfel între diverse părți ale catenei pot fi ionice (ca cele dintre grupa $-NH_3^+$ a Lys și grupa $-COO^-$ a Asp), legături de hidrogen (ca cele dintre Ser și His), forțe van der Waals (ca cele dintre Tyr și Phe). Singurele legături covalente prezente în structura terțiară și care stabilizează această structură, sunt punțile disulfurice formate între resturi de Cys adiacente din diverse porțiuni ale catenei (fig. II.8).

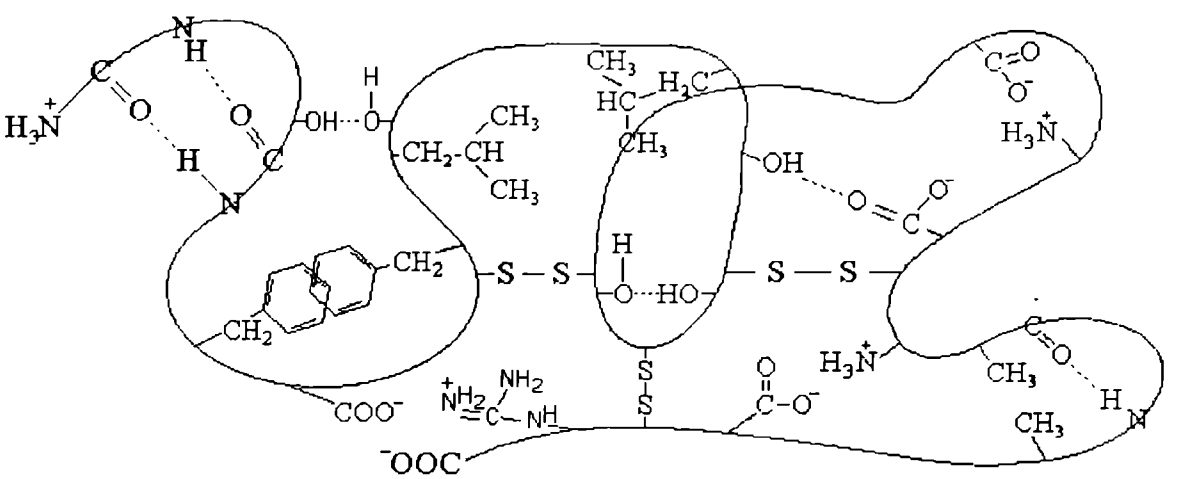


Fig. II.8 Structura terțiară a unei catene proteice

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cristalografia cu raze X a fost utilizată pentru determinarea configurației tridimensionale a unui număr mare de proteine.

În fig. II.9 este prezentată structura terțiară a mioglobinei, proteină asemănătoare hemoglobinei (Perutz şi Kendrew, premiul Nobel – 1962).

Gradul de rezoluție al studilor cu raze X (ca şi al altor studii asemănătoare) nu este suficient pentru a permite vizualizarea atomilor, dar poate servi la aprecierea volumului (grosimii) formelor.

Este important de precizat că structura proteinelor studiate se caracterizează prin prezența pe suprafața moleculelor a unui mare număr de resturi polare de aminoacizi, în timp ce interiorul moleculei este constituit din agregate ale resturilor nepolare existente într-un contact mutual (legătură hidrofobă), care tind să evite contactul cu moleculele de apă.

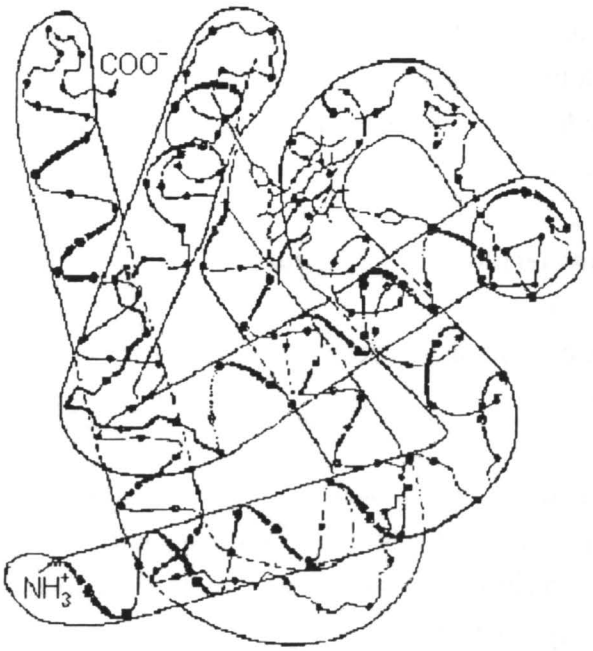


Fig. II.9 Structura mioglobinei

II.3.2.4. Structura cuaternară a proteinelor

Structura cuaternară reprezintă forma cea mai evoluată de organizare a moleculelor proteinelor, datorită complexității lor şi în legătură cu rolul biologic al acestor biomolecule.

Acest tip de structură se descrie ca fiind format din cel puțin două subunități (nu întotdeauna identice), legate între ele prin legături ionice şi/sau de hidrogen, cu formarea unor complexe mari.

Structura cuaternară este caracteristică proteinelor globulare, cu mase de peste 50 kDa, în care catenele polipeptidice posedând toate celelalte tipuri de structuri (primară, secundară, terțiară) sunt asociate prin legături necovalente, formând agregate voluminoase.

Aceste agregate (oligomeri) pot fi disociate în unitățile lor elementare (protomeri) în condiții blânde de denaturare (acidularea sau diluarea soluțiilor de proteine, introducerea de ioni ai metalelor grele etc.). Numărul de protomeri este diferit de la o proteină la alta (tabel nr. II.9).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. II.9

Exemple de proteine cu structură cuaternară

Proteina	Masa proteinei (kDa)	Număr de protomeri	Masa protomerilor (kDa)
Fosfataza alcalină	80	2	40
Creatin kinaza	80	2	40
Hemoglobina	64,5	4	16
Lactat dehidrogenaza	150	4	35
Ceruloplasmina	151	8	18
Aldolaza	160	4	40
Piruvat kinaza	237	4	57
Glicogen fosforilaza	270	4	92,5
Miozina	468	2	212
Glutamin sintetaza	592	12	48,5

Majoritatea virusurilor prezintă o structură cuaternară, complexul proteinic formând o anvelopă protectoare în jurul acizilor nucleici din nucleu, purtători ai informației genetice necesară producerii unor noi particule virale.

Numeroase reacții metabolice sunt catalizate eficient de complexe enzimatice înalt organizate, care împiedică produsul unei reacții să se deplaseze liber în celulă, în timp ce se așteaptă ciocnirea cu o enzimă din proximitate, care declanșează o nouă transformare.

S-a reușit disocierea a numeroase asemenea complexe, obținându-se diversele enzime care le compun. Aceste enzime, după separare, pot fi reasociate "in vitro" în agregate similare celor inițiale. Mai mult decât atât, s-a constatat că diferite enzime obținute prin sinteză se asamblează spontan într-un complex tot atât de eficient ca și cel observat în celulă.

Există și proteine fără structură cuaternară: α-chimotripsina (cu trei catene polipeptidice), ribonucleaza (cu o catenă polipeptidică) etc.

II.3.3. Proprietățile fizice ale proteinelor

II.3.3.1. Solubilitatea

Deși masele lor moleculare pot atinge valori de milioane, numeroase proteine au fost obținute în stare cristalină sau bine purificate până la stadiul de substanțe omogene. În studiul proteinelor se impune luarea unor precauții, pentru că aceste biomolecule pot fi ușor alterate prin variații mari de pH, de temperatură sau de tărie ionică ca și sub acțiunea radiațiilor ultraviolete, a solvenților organici și a unor compuși (detergenți, uree, ioni ai metalelor grele etc.).

Modificările care apar sunt cunoscute sub denumirea de denaturare, putând fi afectată în primul rând conformația spațială a proteinelor (structurile: secundară, terțiară, cuaternară) de care depinde în mare parte acțiunea lor biologică.

Solubilitatea proteinelor depinde de numărul și natura grupelor de pe suprafața macromoleculelor proteice. Astfel, existența unui număr mare de grupe polare, capabile de a

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

forma legături de hidrogen cu moleculele de apă, favorizează solubilizarea proteinelor în apă, defavorizând-o pe cea în solvenți organici.

Dacă pe suprafața moleculelor există însă un număr mare de grupe nepolare, scade solubilitatea în apă și crește solubilitatea proteinelor în soluții alcoolice apoase.

Unii solvenți organici miscibili cu apa, ca metanolul, etanolul, acetona, precipită proteinele din soluțiile lor apoase, datorită atât modificării constantei dielectrice a mediului, cât și efectului deshidratant al solvenților.

Constanta dielectrică (ε) intervine direct în expresia forței de interacție (Coulomb) dintre două particule încărcate electric (e_1 și e_2):

$$F=e_1 \cdot e_2/\varepsilon \cdot r^2,$$ în care r = distanța interparticule

Cum apa are o valoare a lui ε = 80, forța de interacție electrostatică F este redusă, favorizând dispersarea particulelor (moleculelor proteice) în soluție. Introducerea unui solvent organic cu constantă dielectrică mică (etanol, acetonă, metanol) favorizează creșterea valorii lui F și deci aglomerarea moleculelor proteinice, cu precipitarea acestora.

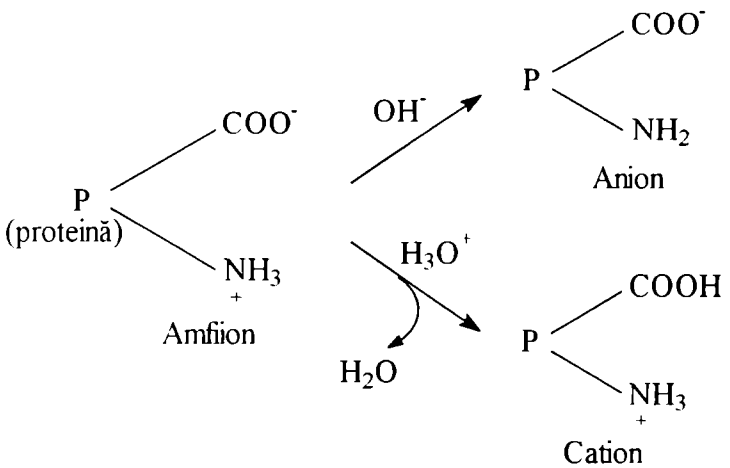
Al doilea efect important al solvenților organici capabili de a forma legături de hidrogen cu moleculele de apă este acțiunea lor competitivă față de apă în raport cu moleculele proteice, ducând la precipitarea acestora prin deshidratare.

În cazul proteinelor globulare, solubilitatea este influențată și de pH, fiind minimă la punctul izoelectric al proteinelor, când starea de amfiioni a moleculelor defavorizează repulsiile dintre acestea și duc la aglomerarea lor.

II.3.3.2. Punctul izoelectric

La fel ca aminoacizii sau peptidele, proteinele prezintă un punct izoelectric specific la care mobilitatea electroforetică este nulă, iar solubilitatea moleculelor proteice în apă este minimă.

Moleculele proteinelor, având caracter amfoter, pot fi titrate atât cu acizi cât și cu baze:



Într-o soluție apoasă de proteină, există un mic exces de anioni, din care cauză soluția prezintă mobilitate electroforetică.

La punctul izoelectric (pH_i sau P_i), moleculele de proteine se vor găsi exclusiv în stare de amfiioni, fără proprietăți electroforetice. La valori de pH < pH_i proteinele au sarcină pozitivă, deplasându-se în câmpul electric spre catod, iar la valori de pH > pH_i sunt încărcate negativ, migrând spre anod.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Viteza de deplasare a ionilor în câmpul electric depinde de mai mulți factori: sarcina electrică a speciilor moleculare, pH, mărimea și forma particulelor, ionii absorbiți și constituie o proprietate utilizată la separarea proteinelor dintr-un amestec, prin electroforeză.

Valori extreme de pH (pH <4 și pH > 9) distrug legăturile ionice și de hidrogen din structura terțiară a proteinelor globulare, ducând la precipitarea (denaturarea) lor.

II.3.3.3. Influența tăriei ionice a mediului

Proteinele se comportă diferențiat față de soluțiile apoase ale sărurilor neutre ale diverșilor cationi. Astfel, soluțiile diluate ale sărurilor alcaline, alcalino-pământoase și ale sărurilor de amoniu favorizează solubilizarea proteinelor globulare. Tăria ionică fiind mică, ionii din soluție neutralizează și stabilizează grupele polare încărcate electric ale moleculelor de proteine. Între ionii de același semn apar repulsii electrostatice, favorizând dispersarea moleculelor proteice în soluție (fenomen denumit "salting-in").

Pe de altă parte, creșterea concentrației sărurilor din soluție (creșterea tăriei ionice) favorizează precipitarea proteinelor, ionii soluției saline intrând în competiție cu proteinele față de moleculele de apă de solvatare din proteine, pe care le extrag.

Acest tip de denaturare prin precipitare cu soluții concentrate de K^+, Na^+, Mg^{2+}, NH_4^+ este reversibil, moleculele proteice revenind la forma și proprietățile inițiale după îndepărtarea agentului denaturant. Denaturarea reversibilă mai poate avea loc și sub acțiunea unor solvenți organici diluați (etanol, acetonă).

Precipitarea ireversibilă este provocată de soluții de săruri ale metalelor grele (Cu, Hg, Fe, Ba, Ni, Zn etc.); în acest caz, îndepărtarea agentului denaturant nu conduce la revenirea moleculelor proteinelor la starea lor inițială.

Denaturarea ireversibilă prin precipitare mai poate fi indusă și de acizii minerali tari (H_2SO_4, HCl, H_3PO_4, $HClO_4$), acizii organici tari (acidul tricloracetic, acidul tanic, acidul picric, acidul sulfosalicilic) sau bazele tari (KOH, NaOH); toți acești agenți, distrugând legăturile ionice și de hidrogen din moleculele proteinelor, duc la dezorganizarea conformației lor spațiale (a structurilor secundară, terțiară și cuaternară) cu dispariția funcțiilor biologice.

II.3.3.4. Agenți denaturanți

În afară de agenții cu tărie ionică mare care au fost amintiți și care pot produce denaturarea ireversibilă a proteinelor cu agregarea (precipitarea) lor, se mai cunosc și alți factori chimici care au acest efect: detergenții (care formează cu ușurință legături de hidrogen cu anumite grupe funcționale din moleculele proteinelor pe care le dezorganizează), ureea, formamida, sărurile de guanidiniu (cu efect asemănător).

În general, mecanismul denaturării variază de la un agent denaturant la altul, în funcție de structura chimică a acestora și de tipul de legături din conformația spațială a proteinelor pe care le afectează.

În afară de agenții chimici, denaturarea ireversibilă a proteinelor poate fi favorizată și de factori fizici: temperaturi mai mari de 50-60°C, radiații UV, ultrasunete, radiații ionizante, agitarea mecanică.

În general, pierderea biospecificității proteinelor este semnalul denaturării lor ireversibile.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.3.3.5. Proprietăți optice

Fiind formate din resturi de L aminoacizi, proteinele prezintă activitate optică în soluție apoasă, semnul și mărimea rotației optice depinzând atât de numărul și activitatea optică a atomilor de carbon asimetrici din moleculă cât și de interacția acestora cu alți atomi.

În cazul structurii secundare α-helix a proteinelor trebuie luată în considerare pe lângă activitatea optică a atomilor de carbon asimetrici din molecula polipeptidică și chiralitatea elicoidală, globală a moleculei. În general, proteinele prezintă în soluție apoasă o rotație optică levogiră, care la proteinele globulare are valori de (-)30° – (-)60°.

În cazul heteroproteinelor, care conțin și grupe prostetice chirale care se adaugă activității optice a apoproteinelor, rezultanta poate fi un unghi de rotație optică dextrogir (hemoglobină, nucleoproteine etc.).

Proteinele denaturate sub acțiunea unor valori de pH mai mici sau mai mari decât pH_i prezintă o levorotație crescută; același lucru se observă și sub influența unor temperaturi ridicate. Explicația acestui fenomen (Doty și colaboratorii) este dezorganizarea (randomizarea) structurii secundare α sub influența factorilor denaturanți.

II.3.3.6. Spectre de absorbție

În spectrele electronice de absorbție a proteinelor se poate identifica un maxim la λ=280nm, datorat prezenței tirozinei și triptofanului care absorb în UV la această valoare.

Heteroproteinele cu grupe prostetice colorate (hemoglobina, cloroplastina), prezintă și absorbții caracteristice în domeniul vizibil al spectrelor electronice de absorbție (λ=400-800nm).

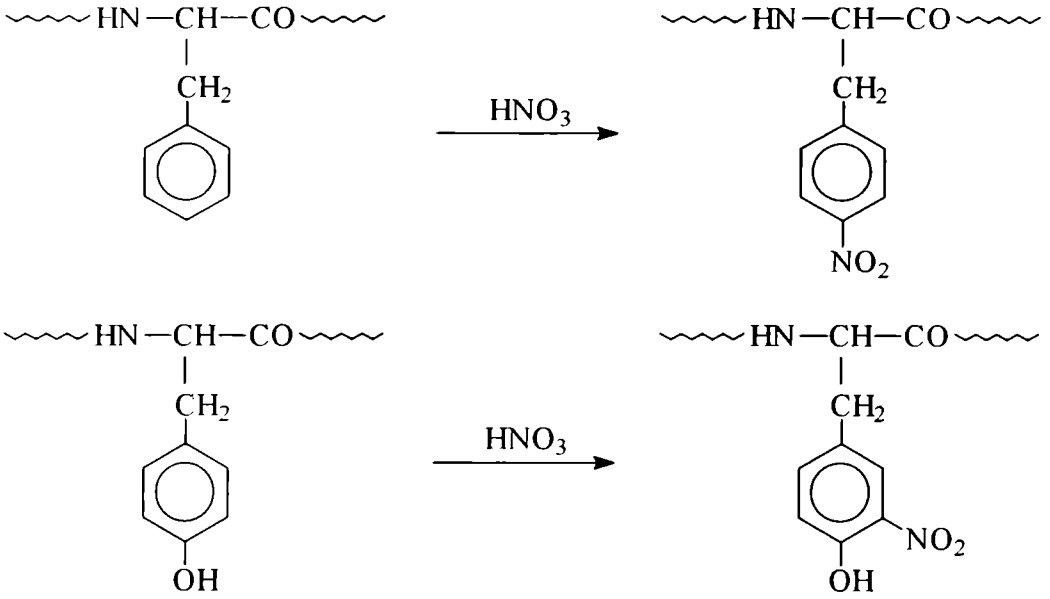
II.3.4. Proprietățile chimice ale proteinelor

Fiind formate din resturi de α-aminoacizi, proteinele (ca și peptidele) pot prezenta proprietăți generale datorate existenței grupelor $-NH_2$ și –COOH terminale, dar și resturilor de aminoacizi polari sau nepolari din moleculă. Aceste proprietăți chimice au fost descrise în cazul peptidelor, multe dintre ele fiind utilizate la determinarea structurii primare a proteinelor.

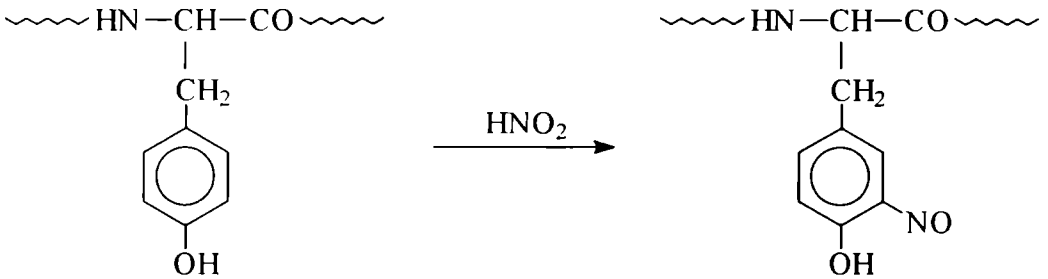
Pe lângă aceste proprietăți chimice generale, proteinele mai pot prezenta și proprietăți specifice; majoritatea acestora sunt reacții de culoare, care se utilizaează la identificarea și dozarea spectrofotometrică, în laboratoarele de biochimie generală, chimie organică, biochmie clinică.

II.3.4.1. Reacția xantoproteică pune în evidență prezența în moleculele proteinelor a resturilor de aminoacizi (hetero)aromatici (Phe, Tyr, Trp, His). Tratate cu acid azotic concentrat, aceste proteine se colorează în galben, datorită formării unor nitroderivați aromatici; coloratia virează spre portocaliu în mediu de hidroxid de amoniu:

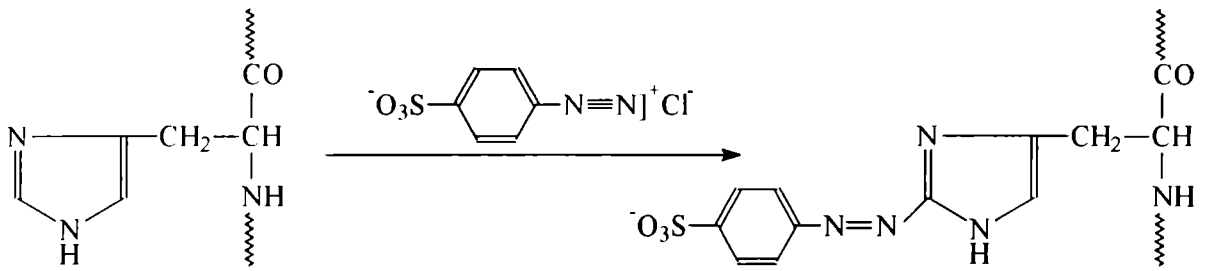
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



II.3.4.2. Reacția Miller este caracteristică proteinelor care conțin tirozină. Sub influența unei soluții de azotat mercuric în acid azotic, în prezența azotitului de sodiu, nucleul aromatic al tirozinei se nitrozează, cu formarea unei soluții sau a unui precipitat roz:



II.3.4.3. Reacția Pauly este de asemenea o substituție aromatică electrofilă caracteristică nucleelor (hetero)aromatice din moleculele tirozinei și histidinei, care se pot cupla cu sarea de diazoniu a acidului sulfanilic, conducând la derivați azoici colorați în roșu-vișiniu:



II.3.4.4. Reacția cu ninhidrină, caracteristică aminoacizilor și peptidelor este pozitivă și pentru proteine, care tratate cu ninhidrină la cald conduc la produși colorați în albastru.

II.3.4.5. Reacția biuretului, caracteristică tuturor proteinelor dar și peptidelor (începând de la tripeptide) utilizează sulfatul de cupru în mediu bazic, care formează complecși colorați în albastru-violet (II.2).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

II.3.5. Proprietăți imunologice ale proteinelor

Organismul uman reacționează prompt la introducerea oricărei substanțe străine, cum ar fi o polipeptidă; el examinează această substanță, cercetându-i caracteristicile structurale chimice care nu-i sunt familiare. Dacă organismul recunoaşte această substanță ca fiindu-i străină (xenobiotică), el provoacă formarea unei polipetide capabile de a se lega specific de materialul străin şi de a-l elimina în mediul înconjurător.

În termeni imunologici, substanța străină este un antigen, iar proteina care provoacă expulzarea acestuia (o gama-globulină din sângele primitorului) se numeşte anticorp.

Reacția antigen-anticorp este o formă de manifestare a specificității proteinelor:

$$Atg + Atc \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Atg - Atc$$

Antigenii compleți pot fi substanțe pure sau amestecuri de substanțe sau particule (celule, fragmente celulare).

Deşi majoritatea antigenilor sunt de natură proteică, mai pot avea acest rol şi alte substanțe: poliglucide, lipide, glicolipide etc.

Se mai cunosc şi haptenele (antigene incomplete) care reacționează cu anticorpii, dar care nu pot induce producerea acestora. Haptenele pot fi molecule relativ simple (steroizi, liberine, medicamente, prostaglandine etc.). Haptenele dobândesc caracter de antigeni numai dacă sunt legate de o proteină purtătoare (transportoare); asociația se numeşte antigenă conjugată.

Substanțele de origine animală care fac parte din structurile proprii ale organismului nu produc anticorpi în organismul respectiv, care şi-a creat în cursul evoluției o toleranță față de acestea.

Cu cât organismele sunt mai îndepărtate taxonomic, față de animalul imunocompetent, cu atât caracterul antigenic este mai pronunțat. Reacția antigenică depinde şi de complexitatea structurală a unor substanțe. Astfel, proteine relativ simple, ca gelatina sau protamina, sunt antigeni slabi.

Molecula antigenului conține pe suprafața sa cel puțin două regiuni de combinare (determinanți antigenici sau epitopi), complementare steric şi chimic anticorpilor specifici.

"Valența" antigenului este numărul total de molecule de anticorpi cu care poate interacționa o moleculă de antigen.

Anticorpii sunt proteine sintetizate de organismul animal care pot reactiona cu antigenii pătrunşi în limfă şi sânge şi care sunt sintetizați de către organism ca răspuns la agresiunea antigenilor.

În general, calitatea de anticorpi o au cinci clase de gamaglobuline, denumite imunoglobuline:

1) IgG (subclase IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4)
2) IgA (subclase IgA_1, IgA_2)
3) IgM
4) IgD
5) IgE

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Singure imunoglobulinele IgG traversează placenta, asigurând fătului anticorpii necesari.

Anticorpii au situsuri specifice epitopilor de pe moleculele antigenilor, situsuri denumite paratopi. Fiecare moleculă de anticorp are două situsuri de legătură (paratopi) complementare epitopilor din antigene (fig. II.10).

În acest fel este posibilă precipitarea complexului antigen-anticorp, inactiv, sub forma unui complex tridimensional, numit precipitat imun.

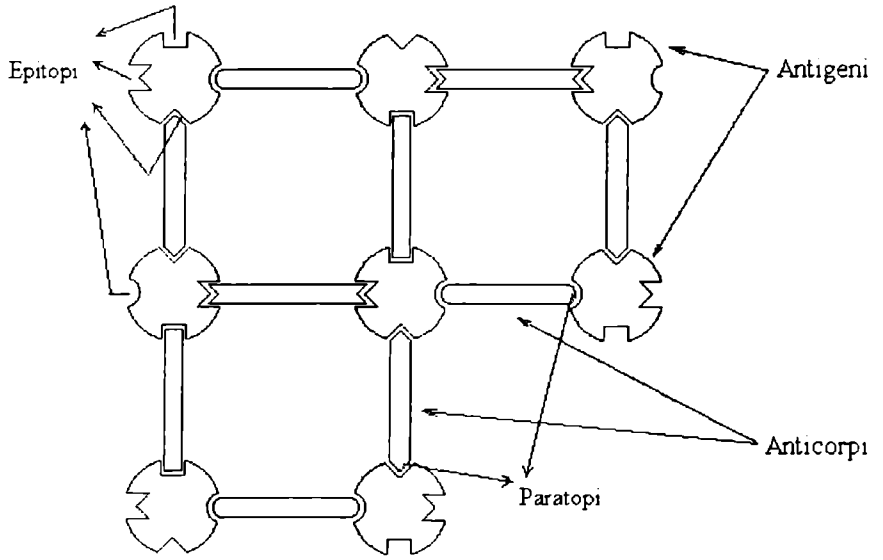


Fig. II.10 Schema unui precipitat imun

Mecanismul asocierii dintre antigen şi anticorp implică pe lângă factorii sterici şi formarea unor legături slabe (de hidrogen, ionice şi van der Waals), necovalente, reversibile, între grupele funcționale de pe epitopi şi paratopi.

Astfel, constanta de echilibru k a reacției antigen-anticorp va fi:

$$k = \frac{[Atg - Atc]}{[Atg]\,[Atc]}$$

Rezultă că prin creşterea concentrației de antigen, constanta de echilibru scade, inhibându-se astfel formarea complexului Atg – Atc; apare o dereglare patologică a funcției imunitare.

Pentru ca răspunsul imunitar să fie normal, complexul antigen-anticorp trebuie să fie solid, insolubil. Un exces de antigen sau de anticorp conduce la un complex solubil, ineficient.

Complementaritatea sterică dintre antigen şi anticorp (de fapt dintre epitopi şi paratopi) este un factor determinant în formarea unui complex imun stabil. Distanța dintre molecula anticorpului şi cea a antigenului propice formării unui asemenea complex trebuie să fie de 0,1 – 0,2 nm.

Deşi în cursul evoluției sale organismul animal şi-a creat o toleranță specifică față de structurile proprii, pot apărea modificări ale acestora, cu inducerea biosintezei unor autoanticorpi.

Sistemul imunitar specific îşi pierde capacitatea de discriminare între structurile proprii şi cele străine, declanşându-se bolile autoimune, care pot avea ca rezultat autodistrugerea organismului. Asemenea boli sunt: anemiile autoimune (declanşate de anticorpii anti-eritroctari),

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

anemia pernicioasă (Biermer) cu blocarea absorbției vitaminei B_{12} la nivel intestinal, lupusul eritematos sistemic (LES), boală de colagen care produce necroza țesuturilor conjunctive din piele, rinichi, splină, articulații etc., artrita reumatoidă (poliartrita cronică evolutivă) cu tumefierea articulațiilor și leziuni ale țesutului conjunctiv din inimă și vase sanguine etc.

În cazul retrovirusului HIV care declanșează SIDA, limfocitele (sediul biosintezei anticorpilor) sunt distruse, expunând organismul unor infecții patogene secundare care nu sunt periculoase pentru un organism normal, neafectat.

Un alt aspect aplicativ al reacției imunologice antigen-anticorp este legat de problema transplanturilor de țesuturi și organe. Datorită specificității ridicate a interacției antigen-anticorp, transplanturile se vor efectua între organisme genetic compatibile, pentru a se elimina riscul respingerii grefelor.

O posibilă cale de eliminare a reacției imunologice este și tratarea pre-operatorie a pacientului primitor cu imunosupresive, care pot anula biosinteza anticorpilor proprii.

Un risc al tratării cu imunosupresive este acela ca o perioadă de timp organismul să-și piardă capacitatea răspunsului imunologic, fiind expus unor agresiuni patogene care în mod normal sunt nepericuloase pentru acesta. Există și riscul ca, după transplant, la un interval de timp variabil, organismul să reia biosinteza anticorpilor specifici, ceea ce duce la respingerea organului transplantat chiar după câțiva ani de la operație.

II.3.6. Câteva clase de proteine

În această secțiune vor fi tratate câteva exemple reprezentative de proteine, atât din punctul de vedere al structurii lor cât și a acțiunii lor biologice.

II.3.6.1. Holoproteine

A. Proteine globulare (solubile)

Acest tip de proteine au fost cel mai studiate. Ele au o formă ovală, cilindrică sau sferică și sunt solubile în apă distilată sau/și în soluții apoase de electroliți.

A.1. Albuminele sunt solubile în apă și în soluții diluate de electroliți; precipită în soluții cu concentrații de peste 50% de sulfați (de amoniu, sodiu, magneziu). Au masa moleculară de ~60 kDa și punct izoelectric slab acid (pH = 5).

Albuminele conțin în principal resturi de aminoacizi dicarboxilici și monocarboxilici (cu excepția glicinei, adesea absentă).

În organismele animale, albuminele se găsesc în citoplasmă și lichide biologice. Ca rol biologic, albuminele animale participă la reglarea pH-ului sanguin; exemple de asemenea proteine sunt: serum albumina (din serul sanguin), ovalbumina (din albușul de ou), lactoalbumina (din lapte), mioalbumina (din mușchi). O albumină patologică este α-feto-proteina izolată din sângele bolnavilor de neoplasm hepatic.

Albuminele din regnul vegetal sunt prezente în toate organele plantelor (adesea asociate cu globulinele), mai ales în semințe: legumelina (din semințele plantelor leguminoase ca soia, mazăre, linte), leucozina (din semințele de ricin), soina (din soia), falina (din ciuperca *Amanitha phalloides*) etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A.2. Globulinele au mase cuprinse în intervalul 120-130 kDa şi un caracter acid pronunţat datorită conţinutului ridicat în glicină, leucină şi aminoacizi dicarboxilici. Au punct izoelectric aproape de pH = 7.

Globulinele sunt insolubile în apă, dar solubile în soluţii diluate de acizi, baze, săruri. Fiind mai puţin solubile decât albuminele, cu care se găsesc adesea asociate, se pot separa de acestea prin diluare cu apă.

Principalele globuline din regnul animal sunt: α, β şi γ-serumglobulinele (din serul sanguin), fibrinogenul (din plasma sanguină), transferinele (pentru transportul fierului), ceruloplasmina (pentru transportul cuprului). Alte exemple de asemenea proteine animale sunt ovoglobulina din ou şi lactoglobulina din lapte.

În regnul vegetal se găsesc: glicina (din soia), vicilina (din porumb), faseolina (din fasole), legumina (din legume), amandina (din migdale), edestina (din cânepă). Globulinele din seminţele plantelor joacă rol de substanţe de rezervă.

În general, globulinele se extrag din ţesuturile animale şi vegetale cu o soluţie de NaCl 5-10%, după care se precipită prin diluarea cu apă a extractului.

A.3. Protaminele sunt proteine cu mase de ~5kDa şi cu caracter bazic (conţin cca 80% diaminoacizi monocarboxilici). Sunt solubile în apă şi în soluţii de electroliţi.

Protaminele se găsesc în regnul animal, conjugate cu acizii nucleici sub formă de nucleoproteine. Ele au fost extrase din celulele spermatice ale peştilor: din somon (salmina), hering (clupeina), din nisetru (sturina), din crap (ciprina).

A.4. Histonele au caracter bazic, conţinând 20-30% diaminoacizi monocarboxilici, fiind mai puţin bazice decât protaminele. Se dizolva în apă şi soluţii diluate de acizi şi baze şi sunt insolubile în amoniac.

Punctul lor izoelectric este plasat în domeniul bazic (pH~10).

În stare liberă, histonele se găsesc în leucocite, sperma peştilor etc.

Histonele sunt asociate cu ADN sub formă de nucleoproteine, prezente în structura terţiară şi cuaternară a ADN şi fiind implicate în reglarea activităţii genelor.

Există cinci tipuri distincte de histone, care au fost izolate prin electroforeză:

- H_1 (cu conţinut ridicat de Lys), cu masa de 23 kDa şi de două ori mai puţin frecvente decât celelalte histone;
- H_2A şi H_2B (cu conţinut moderat de Lys);
- H_3 şi H_4 (cu conţinut ridicat de Arg).

Histonele H_2A, H_2B, H_3 şi H_4 au mase moleculare de 11-15 kDa şi se găsesc frecvent în cromatină.

Histonele vegetale se înrudesc cu cele animale, având ca şi acestea un rol de componentă proteică a nucleo- şi cromoproteinelor vegetale.

A.5. Prolaminele (gliadine) sunt prezente în seminţele gramineelor (mai ales ale cerealelor). Au conţinut ridicat de prolină şi de acizi monoaminomonocarboxilici şi caracter acid pronunţat.

Prolaminele sunt insolubile în apă şi greu solubile în alcalii diluate, etanol absolut, metanol etc., dar se solubilizează în alcool etilic 70% în care se şi extrag, separându-se de alte proteine din amestec.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Fiind sărace în aminoacizi esențiali (Lys și Trp), prolaminele au valoare nutritivă redusă.

Prolaminele se găsesc în: grâu și secară (gliadina), orz (hordeina), porumb (zeina), ovăz (aveina), sorg (cafirina).

A.6. Glutelinele sunt proteine de origine vegetală, fiind prezente în special în citoplasma frunzelor verzi și în semințele de cereale, în care sunt însoțite de prolamine.

Fiind bogate în aminoacizi esențiali, glutelinele au valoare alimentară crescută; caracterul lor acid pronunțat este datorat conținutului în acizi monoaminodicarboxilici. Sunt solubile în soluții alcaline diluate (din care precipită la acidulare) și insolubile în apă, etanol și soluții de săruri.

Cei mai importanți reprezentanți ai glutelinelor naturale sunt glutenina din boabele de grâu și orizeina din boabele de orez.

Pe lângă gluteline, în făina de grâu se mai găsesc: prolamine (mai ales gliadină), albumine, amidon, glucide solubile, lipide și celuloză; tot acest amestec constituie glutenul, care se obține prin frământarea făinei într-un curent continuu de apă. Se obține o cocă lipicioasă, care are proprietatea de a reține bioxidul de carbon degajat în timpul dospirii și coacerii, conferind produselor de panificație un aspect buretos.

A.7. Calmodulina este formată dintr-o singură catenă polipeptidică cu 148 resturi de aminoacizi; are masa moleculară de 16,7 kDa.

Calmodulina, prezentă în toate organismele vegetale și animale, conține: Cys, Trp, Phe și Tyr, pe lângă acizi monoaminodicarboxilici. Prezența acestor acizi determină fixarea a patru ioni de Ca^{2+} per moleculă. Complexul calmodulină-calciu format astfel joacă un rol important în activarea contracției mușchilor netezi și eliberarea substanțelor neurotransmițătoare în terminațiile fibrelor nervoase, ca și în transportul calciului din spațiul intercelular în celulă și în sens invers.

Calmodulina mai intervine și în alte fenomene biologice ca: diviziunea celulară, glicogenoliza, deplasarea cromozomilor în timpul diviziunii celulare, activarea unor enzime etc.

B. Proteine fibrilare (scleroproteine)

Aceste proteine, de origine animală, mai sunt denumite și proteine insolubile, fiind nemiscibile cu apa și cu soluții de electroliți.

Principala lor funcție biologică este participarea la structurarea celulelor animale; se găsesc în special în: piele, vase, unghii și păr, având rol de susținere, protecție și rezistență mecanică și chimică.

Asemenea proteine sunt: keratinele, elastina, fibroina din mătase naturală, colagenul. Structura și rolul lor biologic sunt în strânsă corelație cu tipurile de aminoacizi din catenele polipeptidice.

B.1. Keratinele joacă rol de susținere și protecție, fiind răspândite în epidermă, păr, lână, unghii, copite, coarne, solzi, pene.

După conținutul în aminoacizi bogați în sulf (cisteină și cistină) se clasifică în:

- α-keratine, bogate în resturi de cistină și care conțin majoritatea aminoacizilor prezenți în proteine. Aceste proteine sunt dure, fragile și se găsesc în coarne și unghii (unde contin 22% cistină) sau flexibile (din păr și lână), cu 10-14% cistină. Au structură secundară α predominantă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

α-Keratinele sunt rezistente la acțiunea majorității enzimelor proteolitice, cu excepția celor din molia de haine;

- β-keratinele nu conțin cistină și cisteină, dar sunt bogate în aminoacizi cu molecule mici: Gly, Ala, Ser.

β-Keratinele sunt prezente în firul de mătase naturală produs de *Bombix mori*, în firele de păianjen, în ghearele și ciocul păsărilor, în solzi etc.

β-Keratina din fibroină are structură secundară β în proporție de ~100%.

Firele de lână și păr sunt formate din mănunchiuri de macrofibrile, iar acestea, la rândul lor, sunt formate din fibrile subțiri, alcătuite de-a lungul axei longitudinale a moleculelor proteice.

B.2. Elastina are proprietăți elastice asemănătoare cu cele ale cauciucului; este principala componentă a țesuturilor elastice din plămâni, vase sanguine mari ca aorta (30-50% în greutate produs uscat), ligamente. Se găsește în cantități mici în țesuturile neelastice ale tendoanelor. Conține cantități mici de Hyp, multă Pro (10%), Gly (30%), Lys și aminoacizi nepolari.

Biosinteza elastinei are loc în fibroblaști; se formează întâi proelastina care trece în mediul extracelular unde devine elastină și unde se unește cu colagenul și alți biocomponeți (glucide, lipide).

Elastina are o structură tridimensională, catenele polipetidice fiind reticulate covalent, ceea ce îi conferă stabilitatea, insolubilitatea și elasticitatea specifice.

B.3. Colagenul reprezintă peste un sfert din totalul proteinelor corpului uman. Structura sa secundară specifică (fig. II.6) îi conferă colagenului stabilitate, rezistență mecanică și chimică, caracter hidrofil pronunțat și insolubilitate.

Biosinteza colagenului are loc în fibroblaști, în două etape:

a) Faza intracelulară constă în:

- asamblarea aminoacizilor în catene polipeptidice;
- hidroxilarea unor resturi de Pro și Lys (cu formare de Hyp și Hyl);
- glicozilarea (legarea prin legături glicozidice de glucide, ca: glucoza, galactoza și diglucidele derivate);
- evacuarea în spațiul extracelular sub formă de procolagen.

b) Faza extracelulară cuprinde:

- transformarea procolagenului în tropocolagen prin excizia capetelor N-terminal și C-terminal ale procolagenului;
- asamblarea tropocolagenului în microfibrile;
- agregarea microfibrilelor în fibrilă de colagen;
- agregarea fibrilelor în fibra de colagen.

Colagenul este rezistent la acțiunea enzimelor proteolitice cu exceptia colagenazei. La fierberea cu apă moleculele de colagen suferă o desfacere a legăturilor intercatenare și o hidroliză parțială a legăturilor peptidice, transformându-se în gelatină (solubilă în apă la cald).

Colagenul se reînnoiește în perioade de timp diferite, în funcție de organul din care provine, în stările fiziologice normale stabilindu-se un echilibru între biosinteza și degradarea enzimatică a colagenului (colagenoliza).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Colagenazele implicate în colagenoliză sunt produse de celulele țesutului conjunctiv sub formă de zimogeni inactivi (procolagenaze), care în mediul extracelular se transformă în colagenaze active.

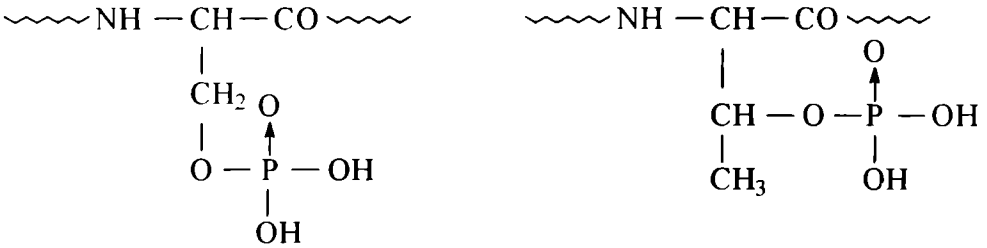
Hidroxiprolina rezultată prin biodegradarea colagenului cu colagenaze, neputând fi utilizată ca atare de către organism la biosinteza colagenului, trece în plasmă şi urină. Dozarea sa în aceste lichide bilogice serveşte la diagnosticarea unor afecțiuni însoțite de colagenolize (unele boli osoase sau hiperparatiroidismul primar).

II.3.6.2. Heteroproteine

Heteroproteinele (proteine conjugate sau proteide), alcătuite dintr-un rest proteic (apoproteină) şi o grupă prostetică, ambele componente fiind legate între ele prin legături covalente sau necovalente (ionice, de hidrogen, van de Waals etc.), se clasifică după natura grupei prostetice.

A. Fosfoproteine

În aceste proteide, grupele prostetice sunt resturi de acid fosforic, legate covalent de apoproteine, prin intermediul esterului fosforic al resturilor de serină sau de treonină:



Prezența resturilor de acid fosforic imprimă fosfoproteinelor un caracter acid, din care cauză ele apar în mediul fiziologic sub forma de săruri cu ioni K^+ sau Ca^{2+}. Aceste proteine se găsesc în produse animale (ouă, lapte etc.), dar şi în bacterii şi drojdii. Ele sunt insolubile în apă şi acizi, dar se dizolvă în soluții alcaline (bicarbonați alcalini).

A.1. Fosfoproteinele din lapte

Conținutul proteic al laptelui este un amestec eterogen format din α, β şi γ-caseine, cunoscut sub numele generic de cazeină. α, β şi γ-Caseinele se deosebesc prin conținutul lor în fosfor şi în aminoacizi, ca şi prin mobilitatea electroforetică, proporția dintre ele fiind de respectiv 75:20:5.

Caseinatul de calciu din lapte nu coagulează la încălzire, împiedicând în acelaşi timp şi precipitarea albuminelor şi globulinelor cu care este amestecat.

Precipitarea caseinei are loc la acidularea până la $pH_i = 4,6$ sau sub influența unor enzime (chimozina din stomacul de miel sau viței sau din culturile de *Mucor mietreii*, sau pepsina). Paracaseinatul de calciu astfel precipitat reprezintă componenta principală a brânzeturilor. Această proprietate stă la baza ramurii industriale de prelucrare a laptelui.

Practic, în industria brânzeturilor se procesează două faze distincte ale coagulării laptelui:

a) faza enzimatică primară, în care o enzimă proteolitică (cheagul sau pepsina) scindează o legătură fenilalanil-metionil din α-cazeină, conducând la micelii metastabile de cazeină;

b) faza neenzimatică, în care are loc separarea paracaseinatului de calciu la cald.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Prima fază are loc la temperaturi scăzute (15°C), iar cea de a doua (cu coeficient de temperatură mult mai mare) are loc prin încălzirea la 37°C.

Caseinele din lapte conțin toți aminoacizii esențiali, ceea ce face ca acesta să aibă o valoare alimentară crescută.

A.2. Fosfoproteinele din ou

Gălbenușul de ou conține un amestec de fosfoproteine diferite, format din: fosfovitină (9,7% P), vitelină (1% P), vitelenină (0,28% P) și livetină (0,05% P). Vitelina și vitelenina sunt complexate cu lecitine, formând fosfolipoproteine.

În albușul de ou este prezentă o fracțiune ovalbuminică fosfoproteică, formată din două componente: A_1-ovalbumina fosfatată, cu doi atomi de fosfor/moleculă și A_2-ovalbumina fosfatată, cu un singur atom de fosfor/moleculă.

B. Glicoproteine

Aceste proteine conjugate contin drept grupă prostetică glucide: monoglucide (manoza, galactoza, fucoza, arabinoza, xiloza, glucozamina, acidul sialic) și oligoglucide. Cele care conțin sub 4% resturi glucidice sunt glicoproteine propriu-zise, iar cele cu peste 4% – mucoproteine.

După modul în care se realizează legătura covalentă între restul de proteină și restul glucidic, există două asemenea categorii:

a) o legătură glicozidică la un atom de oxigen dintr-un rest de serină sau treonină din proteină (fig. II.11a);

b) o legătură glicozidică la un atom de azot amidic al unui rest de asparagină (fig. II.11b):

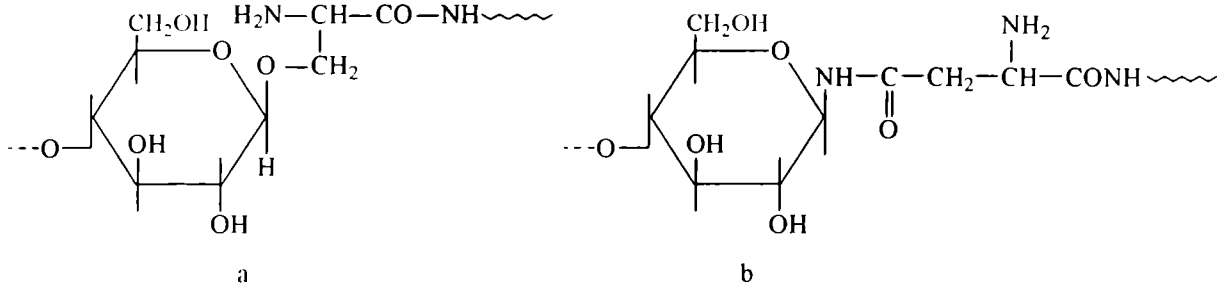


Fig. II.11 Tipuri de legături glicozidice din glicoproteine

Unele proteine (ca receptorul LDL) conțin oligozaharide legate atât prin oxigen cât și prin azot. În timp ce în cazul mucopoliglucidelor (glicozaminoglicani) componenta glucidică este predominantă, în glicoproteine predomină componenta proteică.

Glicozilarea proteinelor are loc în reticulul endoplasmatic și în sistemul Golgi din celule.

În natură, glicoproteinele se găsesc în regnul animal și vegetal ca și în microorganisme (drojdii, virusuri, bacterii), atât în spațiul extracelular cât și în cel intracelular, având roluri biologice diverse ca:

- biocomponenți ai țesutului animal muscular, conjunctiv și sanguin;
- transportori de substanțe biologic active, ca enzime, hormoni, anticorpi, medicamente etc. De exemplu, glicoproteina P este un transportor transmembranar care scoate din celulă substanțele hidrofobe, fiind asociată cu rezistența la medicamente. Celule rezistente la medicamente exprimă în exces gena proteinei P;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- în organismele animale au rol în procesele de apărare (imunoglobulinele), creştere celulară, medierea unor interacţii intercelulare, receptori hormonali, factori ai coagulării sângelui (trombina, fibrinogenul) etc.

C. Lipoproteine

Lipoproteinele sunt particule formate prin asocierea unor proteine hidrofile (solubile în apă) – apoliproteine sau apoproteine, cu lipide nepolare (triacilgliceroli şi esteri ai colesterolului) şi cu lipide hidrofile (fosfolipide, colesterol).

Apoliproteina are o masă moleculară de ~100kDa, fiind formată din mai multe subunităţi identice.

Componenta proteică din lipoproteine, bogată în aminoacizi nepolari se asociază cu lipidele mai ales prin interacţii hidrofobe şi van der Waals, dar şi prin legături ionice (stabilite între grupe ionizate cu sarcini de sens contrar de pe ambele componente ale lipoproteinei).

Lipoproteinele se găsesc in celule, membrane biologice, mitocondrii, în sânge (plasmă şi ser), limfă, în gălbenuşul de ou, în lapte, ca şi în cloroplaste (în regnul vegetal).

Structura şi rolul biologic al lipoproteinelor sunt descrise în capitolul III ("Lipide").

D. Metaloproteine

În metaloproteine, grupa prostetică este reprezentată de un ion metalic cu lipsă de octet (de Fe, Cu, Mg, Zn, Co, Cr, V, Mn) legat de partea proteică prin legături coordinative, în care grupele nucleofile din proteină (ligand) joacă rol de donori de electroni, metalul central fiind acceptor. Se formează un chelat în care grupele cu N şi O din restul proteic au rol de donori.

Pentru formarea unor asemenea legături este necesară dispunere spaţială covenabilă a grupelor donoare de electroni din apoproteină şi a ionilor metalici respectivi.

Metaloproteinele pot conţine unul sau mai multi ioni metalici. Clasificarea lor se face atât după criterii funcţionale (metaloproteine cu rol de bioconstituenţi sau cu rol de efectori biochimici) sau structurale (după natura metalelor).

Funcţiile biologice ale metaloproteinelor sunt variate: proteide de transport pentru metale (transferina – pentru fier şi ceruloplasmina – pentru cupru, ambele fiind plasmatice), proteide de stocare pentru unele metale (feritina – pentru fier), enzime, pigmenţi respiratori (din sângele moluştelor, melcilor, crabilor, homarilor, conţinând Cu sau V şi denumiţi hemocianine) etc.

E. Cromoproteine

Spre deosebire de metaloproteine, în cromoproteine grupa prostetică contine un ion metalic, dar acesta nu este legat direct de apoproteină, fiind componentul unei substanţe colorate ca grupă prostetică.

O categorie importantă din această clasă sunt proteidele în care grupa prostetică, colorată, este o porfirină (cromoproteine porfirinice).

Aceste cromoproteine pot avea sau nu funcţii respiratorii, fiind întâlnite atât în regnul animal cât şi în cel vegetal.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

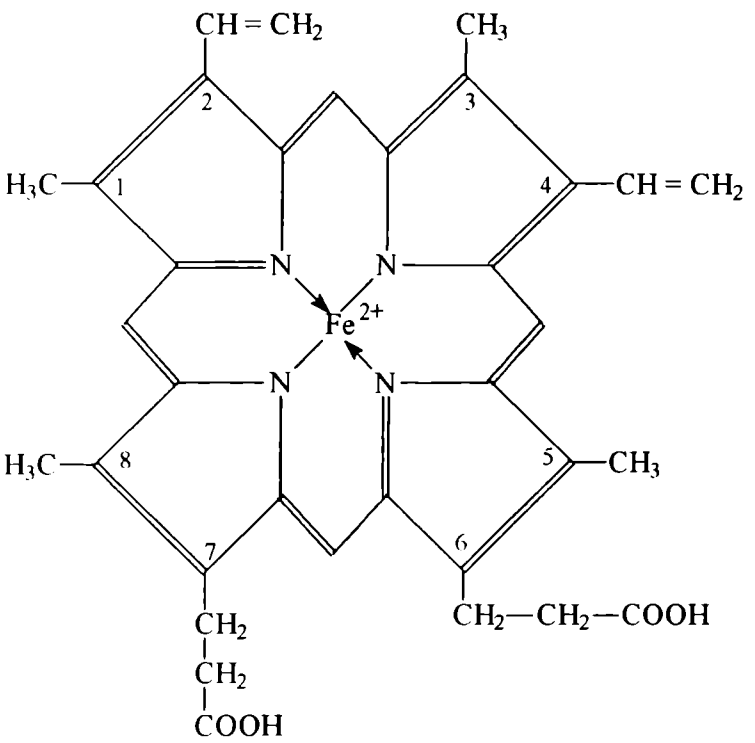
Cele cu funcții respiratorii sunt: hemoglobina, mioglobina, citocromii, catalaza, peroxidazele, iar din categoria cromoproteinelor fără funcții respiratorii: cloroglobuline, ficoeritrine, ficocianine.

E.1. Hemoglobine

Proteinele din această grupă, cu funcții respiratorii în organismele animale, au ca parte prostetică un compus porfirinic colorat (hemul), același pentru toate speciile și o componentă proteică specio-specifică.

Această cromoproteină (notată Hb) care conține fier asigură transportul oxigenului în organismele vertebrate și nevertebrate.

Hemul sau hemina (partea colorată a hemoglobinei) este format dintr-o porfină (1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-6,7-dipropionilporfina) de care se leagă ionul Fe^{2+}, prin două legături covalente și două coordinative, la cei patru atomi de azot din poziția centrală, complexul rezultat astfel fiind plan:



Hem (Hemină)

Hemoglobina este o proteină oligomeră $\alpha_2\beta_2$ (HbA_1) formată din patru lanțuri polipeptidice (globina) legate necovalent, fiecare lanț conținând hemul ca grupă prostetică.

Fiecare protomer α se compune din 141 resturi de aminoacizi, în timp ce protomerii β conțin 146 resturi.

În structura hemoglobinei, ionul Fe^{2+} (cu număr maxim de coordinare 6) mai formează încă două legături coordinative, perpediculare pe planul central al hemului, în care sunt implicate două resturi de histidină din protomeri.

Astfel, la protomerii de tip α, resturile de histidină din pozițiile 58 și 87 (His-58 și His-87) ale lanțului polipeptidic se leagă la hem de o parte și de alta a planului central în două moduri:

- restul de His-87 ("histidină proximală") se leagă direct de atomul Fe^{2+} central, deasupra planului;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- restul His-58 ("histidină distală") se leagă coordinativ de acelşi atom Fe^{2+}, dedesubtul planului prin intermediul unei molecule de apă (fig. II.12), oxigenul acesteia devenind al şaselea ligand.

La protomerii de tip β, His-93 şi His-63 se leagă de hem în mod asemănător:

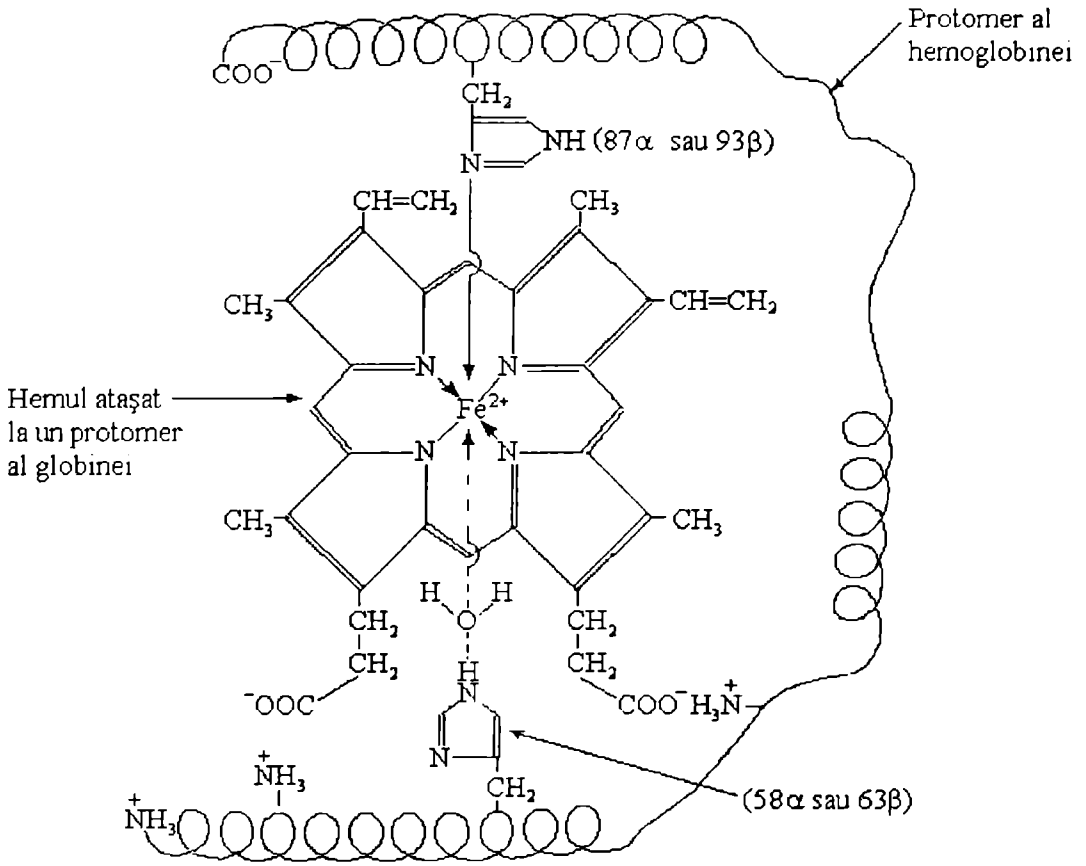


Fig. II.12 Structura schematică a unui protomer de hemoglobină activă

Alte legături care se formează între hem şi globine şi care duc la consolidarea structurii hemoglobinelor sunt:

- două legături ionice dintre grupele carboxilat ale resturilor de acid propionic din C_6 şi C_7 ai hemului şi grupele amino din poziția ε a resturilor de lisină din lanțul protomerilor;

- legături van der Waals formate între radicalii CH_3 (din 1,3,5,8), radicalii vinil (din C_2 şi C_4 ai hemului) şi resturilor nepolare ale unor aminoacizi ca triptofanul şi fenilalanina din protomeri.

În cazul vertebatelor, hemoglobinele au mase de 50-68 kDa, hemul având o pondere de 4%, fierul – de 0,33-0,34%, iar globina – 96% din masa integrală.

Hemoglobinele sunt substanțe solide, de culoare roşie, care cristalizează în sisteme diferite, în funcție de specie ca şi de compoziția şi structura globinelor respective.

Deoarece în hemoglobine, în afară de protomerii α şi β (cei mai studiați) există şi alte tipuri de catene protomere polipeptidice (γ, δ şi ε), acestea prezintă şi o mare varietate funcțională, în strânsă legătură cu structura lor.

Asocierea între ei a protomerilor conduce la specii diferite de hemoglobină (A, E, F, S):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- hemoglobina A (HbA) sau hemoglobina adultului începe să fie biosintetizată din a 25-a săptămână a vieții intrauterine, astfel încât la naştere ajunge la 20%, după 6 luni – la 90% şi la vârsta adultă – la 99%. În sângele adulților, 98% din hemoglobină este HbA_1 ($\alpha_2\beta_2$) şi 2% HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$);

- hemoglobina E (HbE) embrionară are structura ε_4 şi apare în a 12-a săptămână de sarcină; prin evoluția sarcinii, se transformă treptat în structura $\alpha_2\beta_2$ (HbA_1);

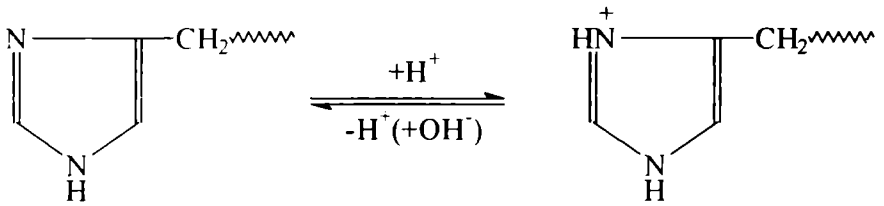
- hemoglobina F (HbF) a fătului, are structura $\alpha_2\gamma_2$ şi este prezentă în sângele fetusului în perioada avansată a sarcinii şi în sângele nou-născutului, având o pondere de ~75% din hemoglobina totală. HbF suferă modificări structurale progresive, trecând în specia $\alpha_2\beta_2$ (HbA_1);

- hemoglobina S (HbS) mutantă, apare ca urmare a unor mutații genetice a ADN-ului care codifică sinteza protomerului β din hemoglobină. Este specifică anemiei falciforme, care se manifestă prin deformarea eritrocitelor, care capătă configurație anormală de seceră (în S), fiind eliminate din circulație. Boala aceasta, ereditară, este răspândită la populațiile din Arabia Saudită, India şi din zonele mediteraneene.

Rolul biologic al hemoglobinei

Funcția biologică a hemoglobinei din eritocite este aceea de pigment respirator, care transportă oxigenul molecular de la plămâni spre țesuturile capilare şi tisulare. În sens invers, dioxidul de carbon rezultat din respirație este transportat de la țesuturile la plămânii vertebratelor.

Alt rol important al hemoglobinei este capacitatea sa de a tampona sângele, datorită resturilor de histidină pe care le conține şi care au proprietăți acceptoare sau donoare de protoni, ceea ce asigură pH-ul fiziologic din sânge (cu valoarea 7,4):



Hemoglobina fixează reversibil oxigenul molecular, vital organismului animal:

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

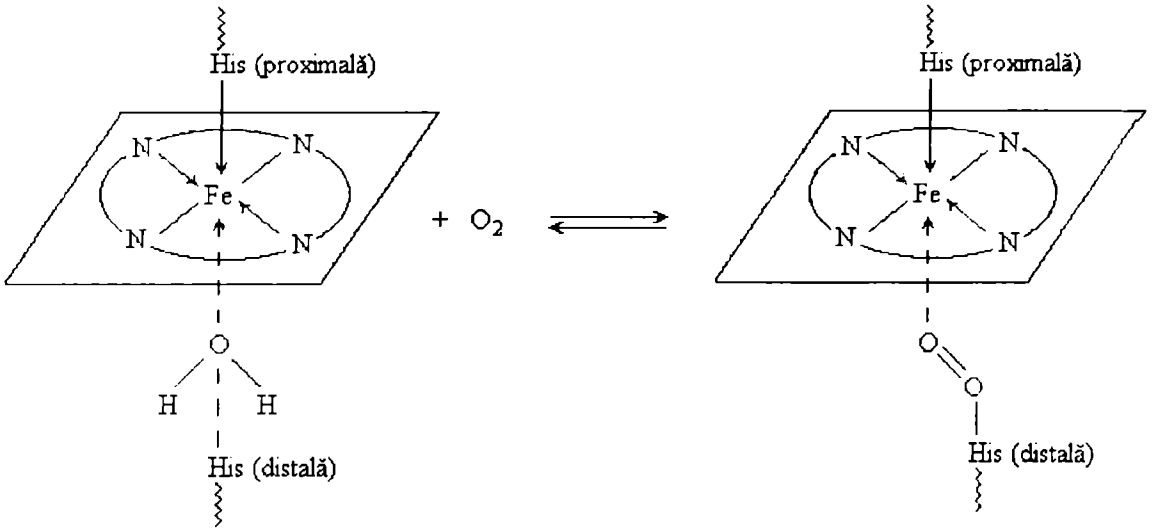
(Oxihemoglobină)

Echilibrul este deplasat într-un sens sau altul, în funcție de presiunea oxigenului din tesuturi.

Astfel, în plămâni , în care presiunea parțială a oxigenului este mare, echilibrul se deplasează spre formarea oxihemoglobinei, în timp ce în țesuturile capilare şi tisulare, unde presiunea oxigenului este mică, oxihemoglobina cedează oxigenul necesar metabolismului celular.

Oxigenul este fixat la nivelul ionului de fier central din hemoglobină, prin înlocuirea moleculei de apă legată de restul de histidină din globină:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Cum Hb este tetrameră, oxigenarea sa totală decurge treptat, cu fixarea a patru molecule de oxigen:

$$Hb \overset{O_2}{\rightleftharpoons} HbO_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_2 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_3 \overset{O_2}{\rightleftharpoons} Hb(O_2)_4$$

Se observă că, în urma oxigenării, ionul Fe^{2+} nu-şi modifică valența, menținându-se coloraţia roşie a hemoglobinei.

La nivelul tisular, presiunea partială a CO_2 rezultat din oxidările celulare fiind mare, are loc o substituție a oxigenului din oxihemoglobină cu dioxidul de carbon, formându-se carbhemoglobina:

$$HbNH_2 + CO_2 \rightleftharpoons \underset{\text{Carbhemoglobină}}{HbNH-COO^-} + H^+$$

Dioxidul de carbon este transportat astfel la plămâni, prin care se eliberează, cu încheierea ciclului respirator.

Hemoglobina poate interacționa şi cu alte molecule care conțin electroni neparticipanți. CO, NO şi H_2S, care joacă rol de donori, înlocuind apa legată de His distală din molecula hemoglobinei. Cantități mari de asemenea compuşi se leagă ireversibil la ionul Fe^{2+} din hem, împiedicând formarea HbO_2 şi blocând procesul respirator, ceea ce duce la asfixierea organismului.

Astfel, Hb se combină cu oxidul de carbon de 200 de ori mai uşor decât oxigenul, cu formare de carboxihemoglobină (HbCO), mult mai stabilă decât HbO_2.

Dacă prezența în sânge a HbCO depăşeşte 50% din totalul Hb, apar semne de intoxicație, ca: cefalee, amețeli, greață, slăbiciune musculară etc., organismul putând deceda prin asfixie. Pentru a deplasa echilibrul în favoarea transformării HbCO în HbO_2, intoxicatul se tratează cu O_2 pur, la presiune ridicată. Dacă conținutul sângelui în HbCO este mai mare de 50%, tratamentul devine ineficient.

Orice agent oxidant care determină transformarea ionului Fe^{2+} din hemoglobină în ionul Fe^{3+}, conduce la o methemoglobină de culoare brună, care îşi pierde principala funcție biologică, de transportor al oxigenului.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Methemoglobina a fost pusă în evidență prin tratarea hemoglobinei cu fericianură de potasiu; ea poate apărea în cantități mari în sânge în urma intoxicațiilor cu compuși chimici oxidanți, pesticide, medicamente ca și în urma unor modificări genetice în secvența aminoacizilor din protomerii α și β ai globinei.

Deși la nivelul eritrocitelor se formează continuu methemoglobină, ea este redusă enzimatic cu methemoglobin reductaze, care determină transformarea met-Hb în Hb, în așa fel încât nu este permis un nivel mai ridicat de 0,4% met-Hb raportat la Hb totală.

E.2. Mioglobina (Mb), cromoproteină globulară de culoare roșie, are o structură monocatenară, formată din 153 resturi de aminoacizi, legată de un rest de hem, ca și în cazul hemoglobinei. Structura secundară a Mb conține porțiuni de α-helix în proporție de 70%, care alternează cu porțiuni randomizate, în proporție de 30%.

Mb are masa de 17 kDa, fiind considerată precursor ancestral al lanțurilor α și β ale globinei din Hb și se găsește în mușchii scheletici, cărora le imprimă o colorație roșie.

Rolul principal al Mb este acela de a fixa oxigenul în țesutul muscular, ca depozit necesar oxidărilor celulare, utilizat pe parcursul eforturilor prelungite.

Oxigenul este astfel stocat în țesutul muscular sub formă de oximioglobină:

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$

(Oximioglobină)

Față de O_2, Mb are o afinitate de 6 ori mai mare ca cea a Hb; rezultă că Mb se asociază cu oxigenul la presiune mult mai mică decât în cazul Hb.

Cantități apreciabile de Mb se găsesc în mușchii striați ai membrelor inferioare și superioare și în miocard. In mușchii unor animale acvatice conținutul de Mb este foarte ridicat, asigurând șederea îndelungată a acestora sub apă.

Ca și în cazul Hb, oxidarea cu fericianura de potasiu a ionului central Fe^{2+} la ionul Fe^{3+} conduce la metmioglobină de culoare brună, care-și pierde afinitatea pentru oxigen.

E.3. Cloroglobine (cloroplastine)

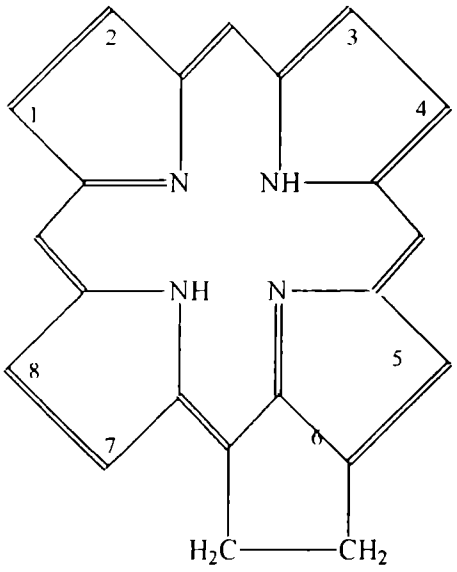
Acestea sunt cromoproteine porfirinice fără funcție respiratorie, de culoare verde, conținute în celulele vegetale și având ca parte proteică plastina, iar ca grupă prostetică – clorofila.

Clorofila reprezintă un complex de pigmenți izolați din frunzele verzi, având un nucleu porfirinic central. Ciclul porfirinic, prezent în toate varietățile de clorofilă, este forbina; în clorofile, ionul central este Mg^{2+} tetracombinat, legat de megaciclul forbinei.

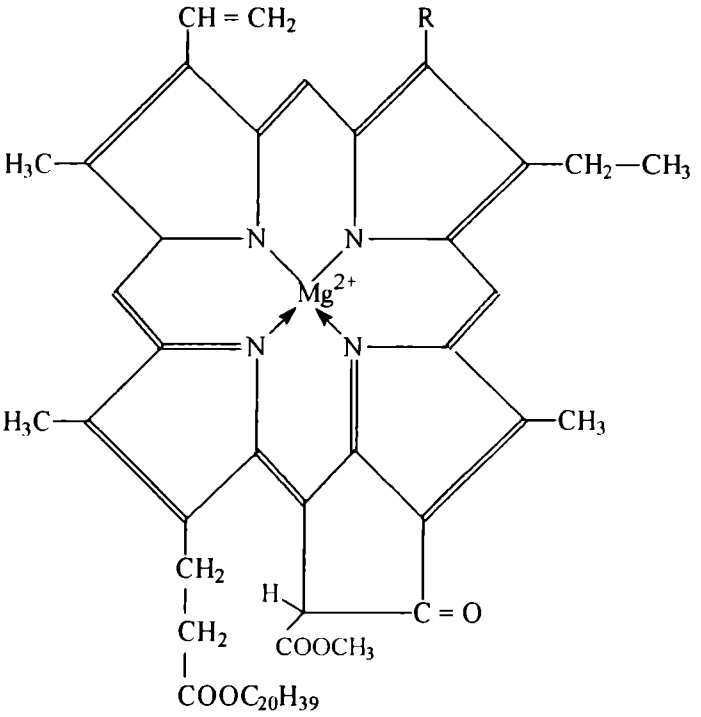
În funcție de substituenții prezenți în pozițiile C_2, C_3, C_4, C_7 pe macrociclul forbinei, există mai multe tipuri de clorofile, prezente în frunzele verzi, în alge sau bacterii.

Astfel, clorofila a (albastră – verzuie) și clorofila b (verde închis) reprezintă pigmentul frunzelor verzi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Forbina



R = — CH_3 : clorofila a;
R = — CHO : clorofila b.

Între plastină şi clorofilă se formează legături necovalente, ceea ce explică uşurința separării acestor două componente.

În frunze, clorofilele a şi b se găsesc în proporție de 3:2, alături de două substanțe de natură carotinoidică, xantofila şi carotina, cu rol esențial în fotosinteză (capitolul I).

Clorofila se izolează din frunzele verzi prin extracție cu acetonă apoasă, urmată de separare cromatografică prin adsorbție pe talc. Astfel obținută, clorofila (cu proprietăți antiseptice) este utilizată ca pigment natural în cosmetică, industria alimentară, farmacie.

II.3.6.3. Proteine toxice

Aceşti compuşi sunt conținuți în toxine, definite ca substanțe chimice toxice, sintetizate în natură de organismele vii. Toxinele includ cele mai puternice otrăvuri de pe planetă, multe dintre acestea având atât caracteristicile armelor biologice cât şi ale armelor chimice de distrugere în masă.

Toxinele se pot clasifica pe bază de: mase moleculare, surse, ținte preferate în organismul uman, mecanism de acțiune.

A. Toxina botulinică cuprinde o serie de şapte serotipuri de neurotoxine înrudite, notate de la A la G. Fiecare serotip este o proteină cu masa moleculară de ~150 kDa, produsă de un anume serotip al bacteriei *Clostridium botulinum*.

În îmbolnăvirile umane sunt implicate mai ales serotipurile A, B, E şi F, dintre care toxina botulinică A este cea mai agresivă. Această toxină este formată din două lanțuri polipeptidice: un lanț uşor (cu masa = 53 kDa), cu acțiune farmacologică şi un lant greu (cu masa = 97 kDa), care mediază legarea toxinei în organism. Cele două lanțuri sunt legate între ele prin cel puțin două punți disulfurice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Toxina botulinică acționează sub formă de aerosoli (cu particule mai mici de 15 μm), atât prin ingerare parentală cât și respiratorie. În acest din urmă caz, efectele apar mult mai rapid, toxina având LD50 la om = 0,003 – 0,07 μg/kgc.

Toxina botulinică se leagă pe receptorii presinaptici ai neuronilor colinergici și blochează secreția acetilcolinei implicată în transmiterea impulsurilor nervoase. Intoxicația clinică a omului a fost denumită botulism.

În doze letale la primate, toxina provoacă paralizia respiratorie, care duce la moarte. Prevenirea intoxicațiilor se face cu vaccin pentavalent A – E.

Toxina botulinică este atât de toxică încât se apreciază că ar fi necesare 8 kg pentru a omorî jumătate din populația de pe 100 km^2.

B. Ricinul este o glicoproteină globulară (lectină) cu masa de 66 kDa, obținută din seminte de Ricinus communis. Are o structură de dimer, format din două lanțuri polipeptidice (A și B), legate printr-o legătură disulfurică.

Ricinul lezează membrana celulară, legându-se de celule prin lanțul B, care interacționează cu galactoza din receptorii specifici de pe suprafața acestora. Într-o etapă ulterioară, legătura disulfurică dintre lanțurile A și B se rupe, lanțul A intrând în celulă, unde se leagă de ribozomi și blochează astfel biosinteza proteinelor specifice.

Toxicitatea cea mai ridicată apare la ingestia pe cale respiratorie (DL50 = 3 – 5 μg/kgc). Moartea este determinată de: necroza ganglionilor, hemoragie gastrointestinală, necroză hepatică, nefrită, splenită, coagulare diseminată intravasculară.

Profilaxia intoxicațiilor se face prin intermediul unui preparat din lanțul A tratat cu formol.

C. Enterotoxina stafilococică B face parte din grupa toxinelor superantigenice, cu efect sistemic pronunțat, prin activarea sistemului imun. Este o proteină cu masa moleculară de 28 kDa, una din cele 7 enterotoxine (toxine intestinale produse de *Staphylococcus aureus*).

Această proteină este destul de stabilă la încălzire, nefiind denaturată decât printr-o fierbere prelungită.

Enterotoxina stafilococică B poate pătrunde în organism pe cale digestivă sau respiratorie; ca armă de distrugere în masă, se răspândește prin aerosoli, formă în care este relativ stabilă. Incapacitatea organismului poate apărea la inhalarea toxinei, pe cale respiratorie, de la o valoare de DL50 = 0,0004 μg/kgc.

Această toxină acționează ca un superantigen; prin legarea cu limfocitele T, ea determină o expansiune sistemică a răspunsului imun, manifestată prin edem pulmonar (la inhalare respiratorie) sau prin necroza gastrointestinală (în intoxicația alimentară). Intoxicația alimentară produce relativ putine decese, dacă este corect diagnosticată și tratată clinic.

II.3.6.4. Enzime

Enzinmele sunt proteine cu activitate catalitică, biosintetizate la nivel celular, în conformitate cu necesitățile metabolismului fiecărui organism.

Din punct de vedere structural, enzimele (biocatalizatori) se pot clasifica la fel ca și alte proteine în:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- holoproteine (proteine simple), formate exclusiv din catene polipeptidice şi

- heteroproteine, formate dintr-o proteină (apoenzimă) şi o grupă prosteică (care poate fi şi o coenzimă) legată covalent sau necovalent de partea proteică. Asemenea grupe prostetice pot fi: ioni metalici, nucleotide, derivaţi ai vitaminelor hidrosolubile etc.

Apoenzima poate fi formată la rândul său din una sau mai multe catene polipeptidice.

Rolul enzimelor este acela de a cataliza reacţii metabolice care, în lipsa lor, ar decurge foarte lent şi la temperaturi ridicate, improprii vieţii.

În calitate de biocatalizatori, enzimele se supun principiilor generale ale catalizei, dar se deosebesc de catalizatorii chimici prin următoarele trăsături specifice:

- acţionează în cantităţi mult mai mici şi cu efecte mult mai intense asupra scăderii energiei de activare a reacţiilor;

- nu se consumă în reacţiile chimice, regenerându-se la sfârşitul acestora;

- catalizează doar reacţii termodinamic posibile, determinând scăderea energiei de activare a substratului;

- în reacţiile reversibile nu modifică starea finală a echilibrului;

- fiind substanţe proteice, se pot denatura în condiţii energice de pH (pH < 4,5-4 şi pH > 9-9,5) şi de temperatură (peste 45-50°C); de aceea, reacţiile enzimatice decurg la temperaturi mult mai mici decât cele chimice;

- natura lor proteică le conferă specificitate de substrat şi de reacţie.

La nivelul celulei vii acţionează peste 2000 de enzime, fiecare dintre ele cu specificitatea sa caracteristică.

A. Nomenclatură. Clasificare.

La stabilirea nomenclaturii enzimelor se respectă urmatoarele reguli:

- Conform Enzyme Commission (E.C.) a Uniunii Internaţionale de Biochmie, enzimele s-au clasificat după specificitatea de reacţie în 6 clase: oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze (tabel nr. II.10).

Tabel nr. II.10

Clasificarea enzimelor

Clasa	Reacţii catalizate	Exemple de subclase	Exemplu ilustrat cu:	
			Denumirea ştiinţifică	Denumirea uzuală
1.Oxidoreductaze	Oxidarea unui substrat (S) concomitent cu reducerea altuia (S'): S redus +S' oxidat→S'redus+Soxidat	1-1 Acţionând asupra grupării -CH-OH	EC 1.1.1.1. Alcool-NAD oxidoreductază	Alcool dehidrogenază
2.Transferaze	Transferul unei grupări G de pe un substrat pe altul $S_1G+S_2 \rightarrow S_1+S_2G$	2-7 Transfer de grupări fosfat (fosfotransferaze)	EC 2.7.1.1. ATP-D-hexozo-6-fosfotransferază	Hexokinază
3.Hidrolaze	Hidroliza legăturilor eter, ester, peptid, glicozil etc.	3-1 Acţionând asupra legăturii ester	EC 3.1.1.8. Acilcolin-acilhidrolază	Colinesterază

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul II.10 (continuare)

Clasa	Reacții catalizate	Exemple de subclase	Exemplu ilustrat cu:	
			Denumirea științifică	Denumirea uzuală
4.Liaze	Îndepărtează grupări de pe substrat lăsând în loc duble legături	4-2 Carbonoxigenliază	EC 4.2.1.2. L-malat-hidroliază	Fumarază
5.Izomeraze	Interconversiunea izomerilor	5-3 Interconversiunea aldozelor și cetozelor	EC 5.3.1.1. D-gliceral-dehid-3-fosfat-ketolizomerază	Triozofosfat izomerază
6.Ligaze	Formarea legăturilor C-O, C-N, C-S în reacții cuplate cu degradare de ATP	6-3 Formarea legăturii C-N	EC 6.3.1.2. L-glutamat-amoniuligază	Glutaminsintetază

- Numele unei enzime se compune din trei părți: prima parte indică substratul specific, a doua parte indică tipul de reacție catalizată, iar a treia parte o reprezintă sufixul "ază".

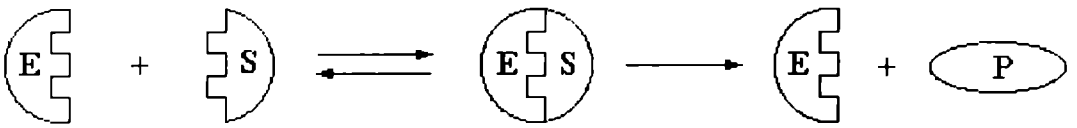
- Informații suplimentare asupra reacției catalizate se pot da in paranteză.

- Fiecărei enzime îi corespunde un număr de cod format din patru cifre: prima cifră indică tipul de reacție (clasa de enzime); următoarele două cifre specifică eventuala subclasă, iar a patra cifră indică în general enzima individuală. Numărul de cod este precedat de inițialele E.C. (tabel nr. II.10).

Uneori se utilizează, pentru simplificare, denumirile triviale (uzuale) ale enzimelor: lactat dehidrogenaza sau L-lactat:NAD oxidoreductaza (E.C.1.1.1.27); catalaza sau H_2O_2: H_2O_2 oxidoreductaza (E.C.1.11.1.6); lipaza sau triacilglicerol acilhidrolaza (E.C.3.1.1.3); enzimă Bollum sau ADN nucleotidil exotransferaza (E.C.2.7.7.31) etc.

B. Structura enzimelor

Situsul (centrul) catalitic al enzimei a fost definit inițial ca o microincintă în structura conformațională (terțiară) a părții proteice a enzimei, care conține un număr mic de resturi de α-aminoacizi dispuși într-un anumit aranjament complementar din punct de vedere steric structurii substratului, după nucleul lacăt-cheie:



, în care:

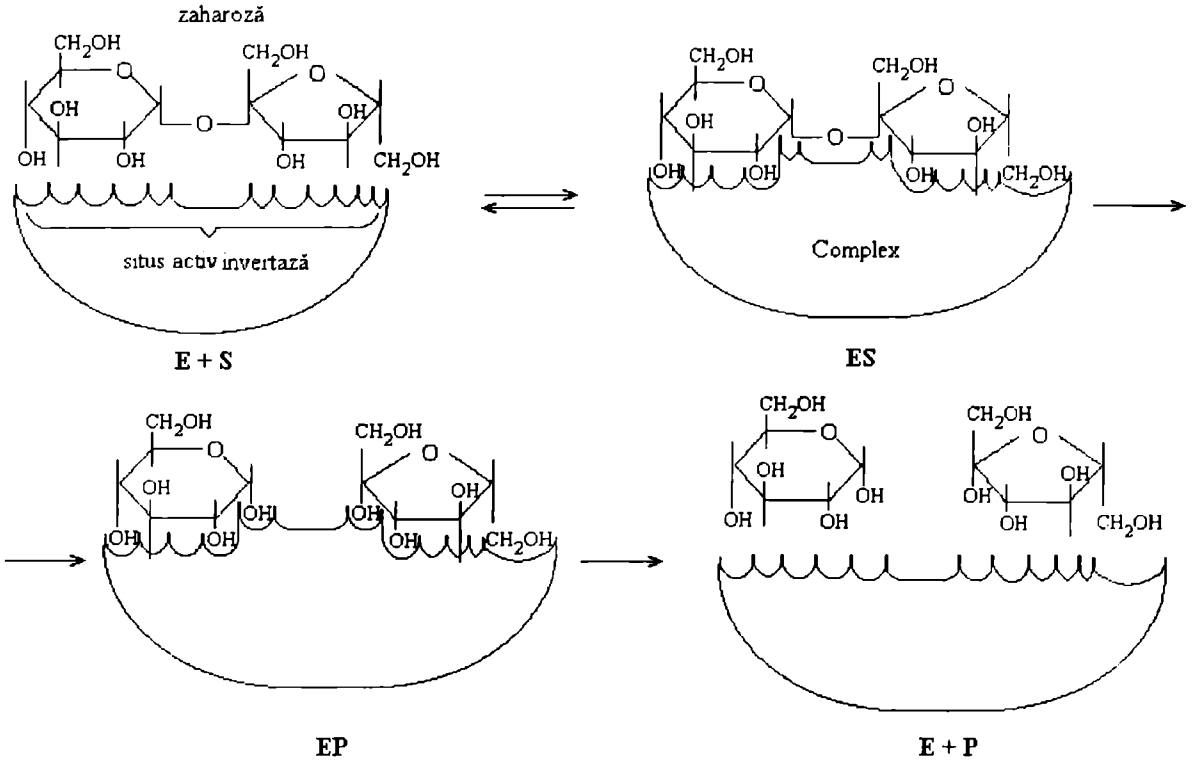
E = enzimă;

S = substrat;

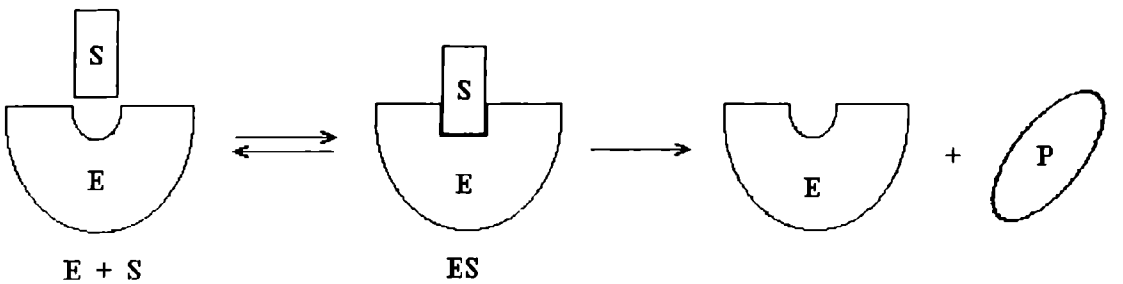
P = produs de reacție.

Mecanismul de tip lacăt-cheie în cazul invertazei (care hidrolizează legăturile β fructozidice ale zaharozei) poate fi schematizat astfel:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Teoria modelului lacăt-cheie s-a dovedit a fi depăşită. Există dovezi care arată că zona activă a enzimei prezintă o oarecare plasticitate, astfel încât substratul specific, "formator", poate induce modificări sterice ale situsului catalitic, făcând posibilă complementaritatea sterică enzimă – substrat.



Pe molecula apoenzimei mai pot fi prezente şi zone alosterice, separate de situsul catalitic, care pot fixa molecule diferite de cele ale substratului (inhibitori, activatori alosterici, produşi de reacţie etc.). Acest fenomen determină o reglare a activităţii enzimei, inclusiv modificarea afinităţii sale faţă de substratul specific.

Între enzimă şi substratul specific se formează legături necovalente, reversibile (legături de hidrogen, electrostatice, van der Waals, coordinative, hidrofobe, interacţii cu transfer de sarcină).

Dacă enzima este o holoproteină, aminoacizii din situsul catalitic vor fi orientaţi în spaţiu altfel decât cei din restul catenei polipeptidice şi grupaţi pe o arie cu un diametru de 1 – 3 nm, în interiorul moleculei proteinei.

În cazul enzimelor de tip heteroproteine (metalo-enzime, NAD- şi FAD-enzime etc.), grupa prostetică este plasată în centrul (situsul) activ.

Factori exteriori de mediu care duc la denaturarea enzimei (valori extreme de temperatură, pH, tărie ionică, radiaţii UV, ultrasunete, detergenţi, solvenţi organici etc.) au ca rezultat modificarea conformaţiei spaţiale a centrului activ, făcând imposibilă formarea complexului

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

enzimă-substrat. În consecință, activitatea biocatalitică a enzimei dispare. Denaturarea poate fi (ca şi în cazul altor proteine) reversibilă sau ireversibilă.

În majoritatea cazurilor, substratul specific joacă rol protector pentru enzimă, căreia îi conservă structura centrului activ.

În mediul lor natural, majoritatea reacțiilor enzimatice decurg în prezența apei; o parte din enzime acționează însă şi în condiții hidrofobe, în prezența unei membrane sau legate de ea. Pornind de la aceste observații, s-au pus la punct reacții enzimatice "in vitro", în mediu neapos.

Necesitatea desfăşurării unor asemenea reacții se impune din două motive principale:

- dificultatea îndepărtării apei (cu punct de fierbere ridicat) din produşii de reacție şi
- posibilitatea ca, în mediu apos, să aibă loc reacții secundare (hidrolize, izomerizări, polimerizări, transesterificări, racemizări etc.), care au drept consecință scăderea dramatică a randamentului reacției principale şi impurificarea produşilor de reacție.

În aceste cazuri, se recomandă să se lucreze cu enzime în mediu neapos (în solvenți organici nemiscibili sau greu miscibili cu apa).

Solvenții organici complet anhidri nu pot conserva activitatea biocatalitică a enzimei, pentru aceasta fiind obligatorie prezența unor urme de apă.

Cantitatea de apă prezentă în mediu pentru conservarea activității biocatalitice diferă de la o enzimă la alta. Astfel, α-chimotripsina rămâne activă în prezența a 50 molecule de apă/moleculă de enzimă, pe când polifenoloxidaza necesită prezența a $3,5 \cdot 10^7$ molecule de apă/moleculă de enzimă.

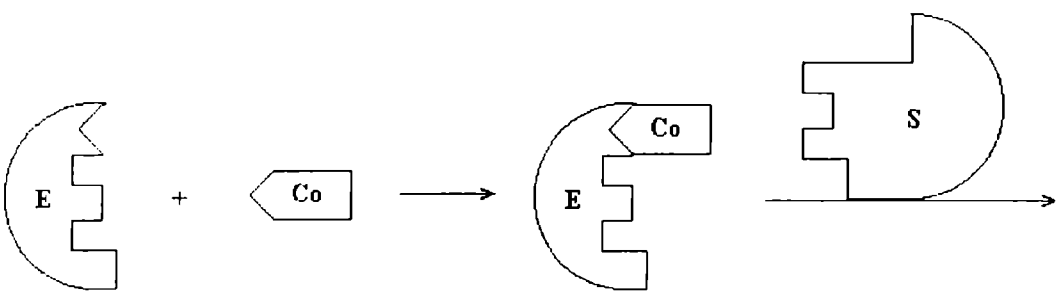
Se ştie că în sistemele biologice, peste 98% din apă serveşte ca solvent ("apă liberă") şi numai o cantitate de sub 2% apă este reținută pe molecula enzimei, sub formă de "apă legată", care conservă activitatea sa biocatalitică.

De aceea, atunci când se lucrează în solvenți neapoşi, aceştia nu trebuie să fie complet anhidri, pentru că ar extrage "apa legată" denaturând enzima. Pentru a evita acest lucru, solvenții utilizați ca mediu de reacție se presaturează cu apă.

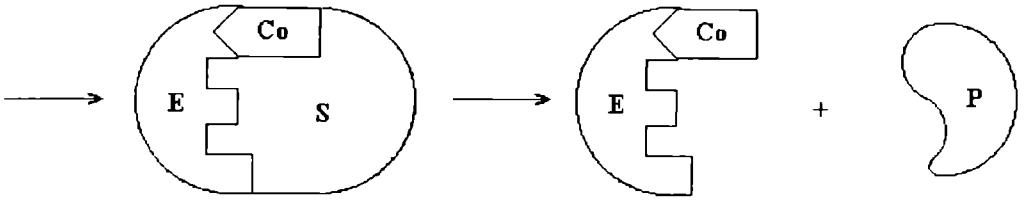
C. Coenzime

Majoritatea enzimelor (din clasele E.C.1, E.C.2, E.C.4 şi E.C.6 din tabelul nr. II.10) necesită prezența obligatorie a unor cofactori (coenzime), al căror rol se aseamănă cu cel al cocatalizatorilor din cataliza chimică.

La fel ca şi aceştia, coenzimele participă la reacții biocatalitice, regenerându-se la sfârşitul lor. În aceste cazuri, pentru ca reacția să aiba loc, este obligatorie formarea intermediară a complexului enzimă-coenzimă (Co)-substrat:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Asadar, rolul coenzimelor este acela de a mări activitatea biocatalitică a enzimelor; legarea lor la situsul specifice se poate face prin legături covalente (ca în cazul FAD din glucozoxidază) sau necovalente (ca în cazul ionilor Me^{+}, Me^{2+} sau a nucleotid coenzimelor ca: NAD^{+}, $NADP^{+}$, NADH, NADPH, CoA-SH etc.).

Spre deosebire de enzime, cofactorii nu au structură proteinică, fiind specii moleculare relativ mici (nucleotide, ioni metalici, derivați ai vitaminelor din grupul B etc.), din care cauză nu prezintă specificitate de substrat.

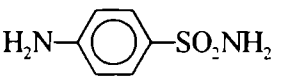
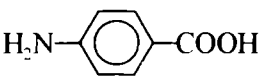
In sistemele biologice, coenzimele se regenerează în totalitate la sfârşitul reacțiilor, putând participa la un număr infinit de transformări de acelaşi fel.

D. Inhibitori

Sub această denumire sunt grupați efectorii care, introduşi în amestecul de reacție, provoacă scăderea vitezei reacțiilor enzimatice, jucând un rol important în reglarea funcțiilor organismului şi în elucidarea mecanismului de acțiune a unor medicamente.

Inhibitorii pot fi:

1° Inhibitori competitivi, cu o structură chimică asemănătoare substratului, cu care concurează în formarea complexului E – S, prin ocuparea situsului enzimatic activ.

Efectul acestor inhibitori poate fi contracarat prin creştrea concentrației substratului specific S, astfel încât viteza de formare a complexului E – S să fie mai mare decât cea a complexului E – I (inhibitor). De exemplu, sulfamidele de tip:  analogi chimici ai acidului p-aminobenzoic (PAB):  inhibă sistemele enzimatice ale microbilor care consumă PAB.

2° Inhibitorii necompetitivi, cu structură diferită de cea a substratului, nu pot fi concurați prin creşterea concentrației acestuia.

Unii dintre aceşti inhibitori pot fi reversibili (se desprind cu uşurință de pe molecula enzimei), în timp ce alții, care nu pot fi îndepărtați, acionează ca "otrăvuri" ale enzimei (ioni ai metalelor grele, iodacetamida etc.). Astfel, aspirina şi antiinflamatorii nesteroidici acționează ca inhibitori necompetitivi, ireversibili ai ciclooxigenazei din plăcuțele sanguine.

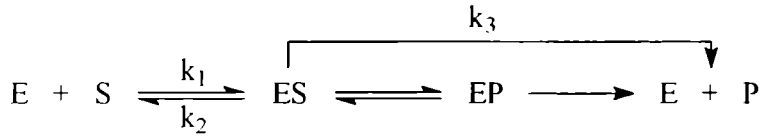
3° Efectorii alosterici se fixează pe situsul alosteric al enzimei, producând modificări conformaționale "la distanță" ale sistemului catalitic.

Aceste modificări pot avea drept consecință fie reducerea (inhibarea), fie accentuarea afinității enzimei față de substrat. Astfel, citratul are efect inhibitor asupra procesului de glicoliză, dar activează biosinteza de acizi graşi.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

E. Aspecte ale cineticii reacțiilor enzimatice

Considerând cel mai simplu sistem enzimatic reacțional, cu un singur substrat, reacția care are loc se poate reprezenta astfel:



(1), în care k_1, k_2 şi k_3 sunt constantele de viteză corespunzătoare etapelor reacționale.

Viteza unei reacții enzimatice este influențată de un mare număr de variabile; o reprezentare aproximativă a acesteia incluzând aceşti parametri:

V = f {T, [E], pH, [P], [S], [J], I, t} (2), în care:

T = temperatura; t = timpul de reacție;

[E] = concentrația enzimei;

[P] = concentrația produsului de reacție;

[S] = concentrația substratului;

[J] = concentrația inhibitorului;

I = tăria ionică; t = timpul de contact.

1° Concentrația enzimei

Se observă că la o concentrație constantă de substrat, viteza reacțiilor enzimatice creşte până la o anumită limită (caracteristică fiecărei enzime), peste care au loc abateri de la proporționalitate (fig. II.13).

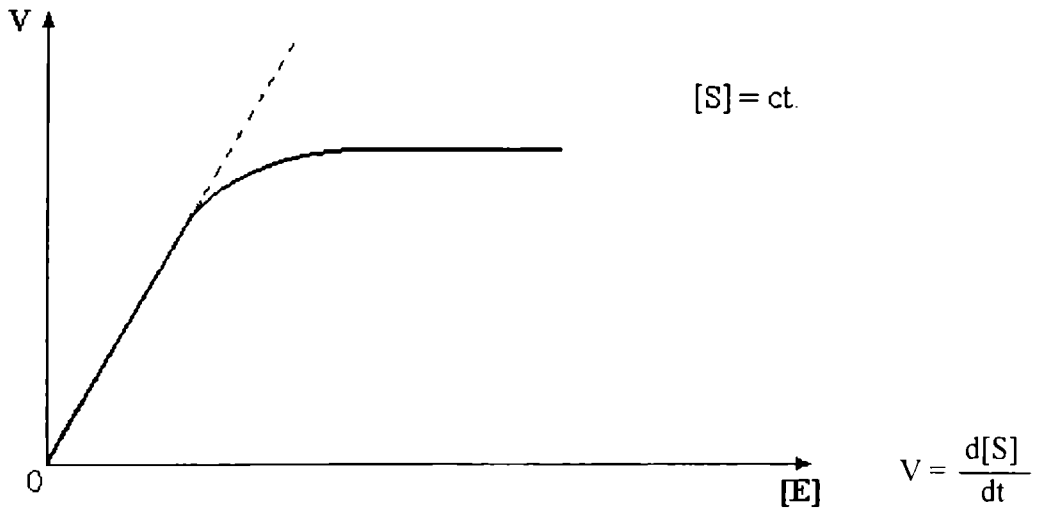


Figura II.13 Influența concentrației enzimei asupra vitezei reacției enzimatice

2° Influența pH-ului

Variațiile de pH ale mediului pot modifica starea de ionizare a moleculei enzimei, cu efect imediat asupra afinității acesteia față de substrat şi implicit asupra vitezei de reacție (fig. II.14).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

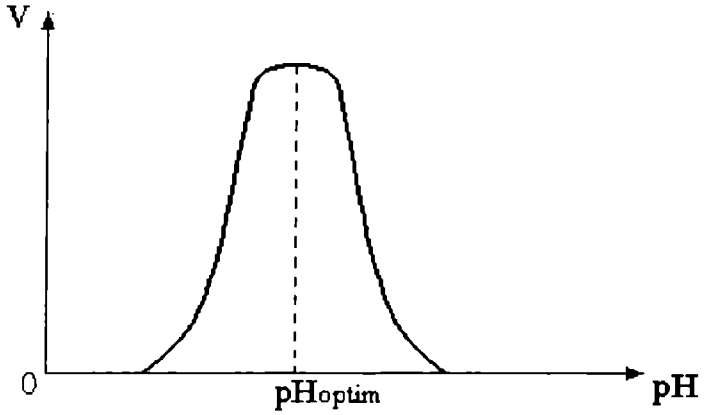


Fig. II.14 Influența pH-ului asupra vitezei reacției enzimatice

Fiecărei enzime îi corespunde un pH optim, pentru care viteza reacției enzimatice este maximă. Valori extreme de pH (pH<4 şi pH>9,5) pot denatura ireversibil enzima, dezactivând-o; pH-ul optim al enzimelor se asigură cu ajutorul soluțiilor tampon.

Variații ale pH-ului optim pot avea loc sub influența temperaturii, dar şi a naturii substratului sau a sursei din care se izolează enzima.

3° Influența temperaturii

În general, se ştie că viteza reacțiilor chimice creşte cu temperatura. O creştere pronunțată a temperaturii poate duce însă la denaturarea enzimelor, care are loc peste 55 – 60°C, cu excepția enzimelor termofile din apele termale, care rămân active şi peste 85°C. Este deci vital ca în timpul reacțiilor enzimatice temperatura să fie strict controlată.

Temperatura optimă de reacție este caracteristică fiecărei enzime în parte, situându-se în majoritatea cazurilor în intervalul +35 - +40°C şi este o rezultantă a curbelor de activare şi inactivare a enzimei respective în funcție de variațiile de temperatură (fig. II.15).

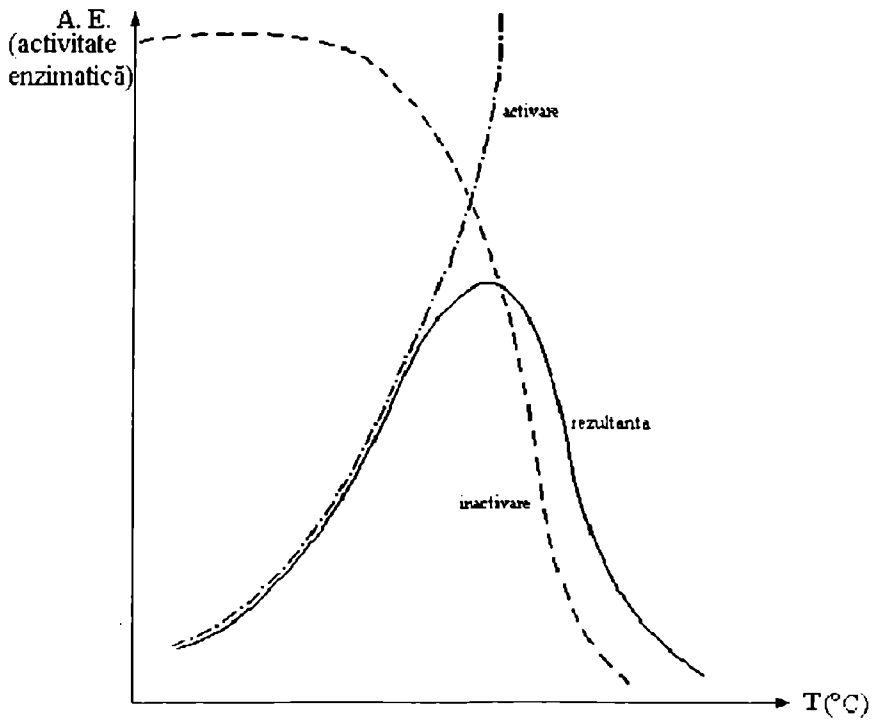


Fig. II.15 Efectul temperaturii asupra activității enzimatice

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

4° Influența timpului de contact dintre enzimă și substrat

În funcție de tipul reacției enzimatice, aceasta poate avea durată diferită. Se observă că, pentru fiecare enzimă în parte, concentrația produsului de reacție crește cu timpul, tinzând să scadă până la anulare, când echilibrul de reacție a fost atins (fig. II.16).

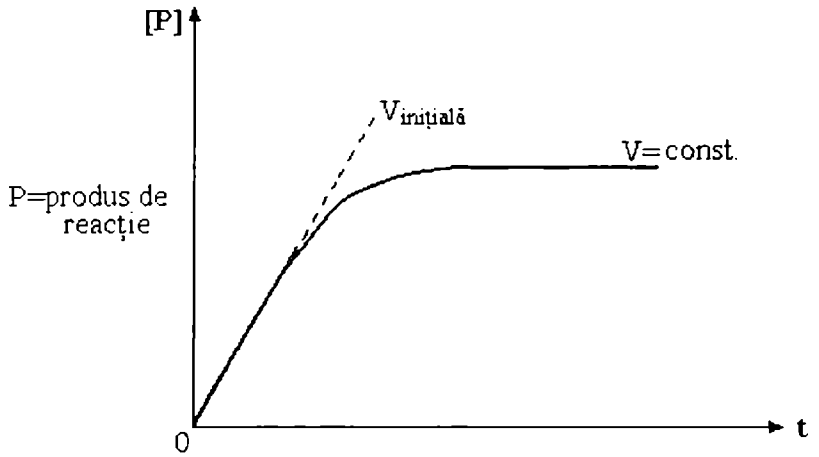


Fig. II.16 Variația vitezei de reacție enzimatice cu timpul

Deoarece pe parcursul reacției pot apărea fenomene care influențează viteza de reacție (creșterea concentrației produsului, scăderea concentrației substratului, denaturarea enzimei etc.), aceasta trebuie măsurată după o incubare de câteva minute a enzimei cu substratul.

5° Influența concentrației substratului

În fig. II.17 este reprezentată variația vitezei unei reacții enzimatice în funcție de concentrația substratului, pentru un sistem bine definit în: concentrația enzimei, pH, temperatură, tărie ionică. Se observă că viteza de reacție crește cu concentrația substratului, tinzând spre o valoare maximă (V_{max}) caracteristică fiecărei enzime; pentru concentrații mai mari, viteza reacției devine independentă de acestea.

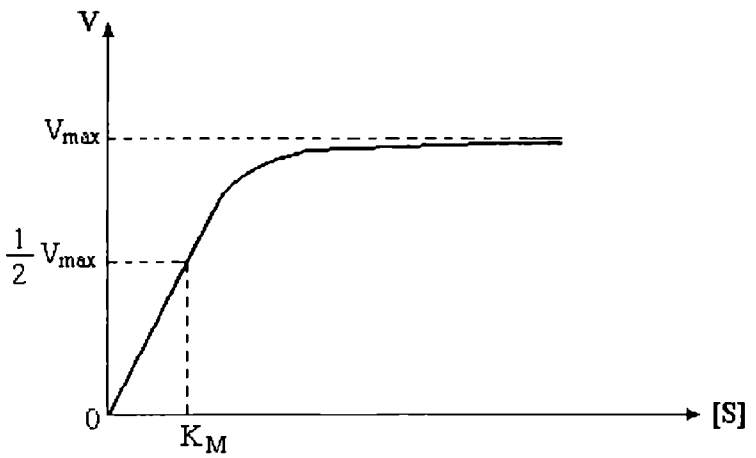


Fig. II.17 Variația vitezei nei reacții enzimatice în funcție de concentrația substratului

Se observă că $\frac{1}{2} V_{max}$ corespunde unei concentrații K_M de substrat, caracteristică fiecărei enzime în parte (K_M = constanta Michaelis-Menten).

Viteza de reacție se exprimă prin ecuația Michaelis-Menten:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$ (3), în care $K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$;

k_1, k_2 şi k_3 au semnificaţiile corespunzătoare reacţiei (1).

În cazul în care viteza de reacţie este jumătate din V_{max} ($V = \frac{V_{max}}{2}$), ecuaţia (3) devine:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$, din care rezultă:

$K_M = [S]$ (moli/l).

Se observă că valoarea K_M este independentă de concentraţia enzimei; această constantă este o măsură a afinităţii enzimei pentru substratul său specific, fiind invers proporţională cu afinitatea:

$$K_M = \frac{1}{\text{afinitate}}$$

6° Influenţa tăriei ionice

Tăria ionică a mediului de reacţie, ca şi natura tamponului pot deplasa echilibrul reacţiei. Variaţia tăriei ionice a soluţiei poate determina desfacerea legăturilor dintre enzimă şi substrat, prin modificarea afinităţii dintre ele.

În general, se observă pentru fiecare enzimă o creştere uniformă a valorii K_M odată cu tăria ionică a mediului.

Acest lucru se explică prin acţiunea denaturantă pe care valori mari ale tăriei ionice o au asupra proteinelor.

7° Concentraţia produsului de reacţie

În fig. II.16 a fost reprezentată variaţia concentraţiei produsului unei reacţii în timp, făcându-se observaţia că abaterea de la viteza de reacţie iniţială depinde de natura enzimei; ea este însă influenţată şi de natura produsului de reacţie, acumularea acestuia putând avea diverse efecte ca:

- reversibilitatea reacţiei;
- transformarea reacţiei într-una de echilibru;
- iniţierea unei inhibări a enzimei, cu scăderea corespunzătoare a vitezei reacţionale.

Astfel, în cazul în care produsul unei reacţii enzimatice est un inhibitor competitiv, acumularea de produs şi consumarea substratului influenţează direct viteza reacţiei enzimatice.

8° Acţiunea concentraţiei inhibitorilor

Urmele de inhibitori nu reprezintă o problemă la începutul reactiei enzimatice, dar pe măsură ce aceasta avansează, contactul prelungit cu inhibitorii din soluţie poate duce la dezactivarea enzimei.

Inhibitorii acţionează atât prin scăderea activităţii enzimelor cât şi prin epuizarea substratului.

Efectul inhibării prin acumularea produsului de reacţie prezintă un interes particular când produsul este acid sau bazic, în aceste cazuri reacţia enzimatică putând conduce la o modificare a pH-ului mediului şi deci şi a activităţii enzimei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Echilibrul reacției enzimatice poate fi deplasat în sensul dorit prin eliminarea din mediu a produşilor cu acțiune inhibitoare. De exemplu, ionul fosfat eliberat de către fosfataze, având efect inhibitor, impune eliminarea sa din mediu.

Metalele grele fiind inhibitori enzimatici irevesibili, acțiunea lor poate fi evitată prin introducerea în mediul de reacție a unor mici cantități de agenți complexanți (EDTA).

Efect inhibitor pot avea şi detergenții utilizați pentru spălarea sticlăriei de laborator. Reactivi ca soluțiile de NADH (H^+) şi NADPH (H^+) se descompun în timp, cu formare de produşi cu acțiune inhibitoare. De aceea, se recomandă utilizarea lor numai sub formă de soluții proaspăt preparate.

F. Specificitatea de substrat a enzimelor

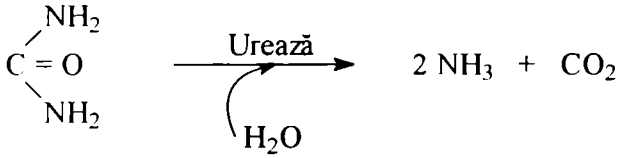
Specificitatea de substrat a enzimelor este determinată de capacitatea acestora de a "recunoaşte" substratul, formând cu el complexul intermediar enzimă-substrat.

În funcție de această capacitate, enzimele pot prezenta o specificitate restrânsă sau o specificitate largă de substrat; această calitate a enzimelor este deosebit de importantă pentru reacțiile metabolice din celulele vii.

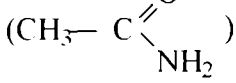
Pe baza studiilor efectuate cu enzime şi substrate înalt purificate, s-a stabilit o clasificare a enzimelor după specificitatea lor de substrat, în patru categorii:

1° Enzime cu specificitate absolută de substrat

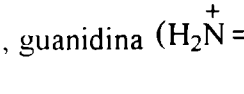
Această categorie cuprinde enzimele care "recunosc" exclusiv un singur substrat. Un exemplu este ureaza, prima enzimă obținută în stare cristalină şi care catalizează exclusiv scindarea hidrolitică a ureei:



Situsul catalitic al ureazei nu "recunoaşte" analogii izoelectronici ai ureeei ca: acetamida



, guanidina



etc.

2° Enzime cu specificitate largă de grup

Aceste enzime prezintă specificitate pentru o anumită reacție, fiind active față de substrate înrudite structural; ele acționează asupra unor legături din molecula substratului, indiferent de structura chimică a restului moleculei.

De exemplu, lipazele hidrolizează legăturile esterice ale mono-, di- şi trigliceridelor, dar şi grupele esterice ale altor compuşi, din clase diferite (esteri ai unor acizi organici cu alcooli aciclici sau ciclici).

α-Chimotripsina scindează hidrolitic grupele esterice ale L-α-aminoacizilor aromatici (Phe, Tyr, Trp), dar şi esterii altor acizi aromatici (hidroxiacizi, halogenoacizi, cetoacizi etc.).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

3° Enzime cu specificitate restrânsă de grup

Enzimele din această categorie acționează asupra unor substrate cu structură chimică asemănătoare, care posedă aceleaşi tipuri de legături.

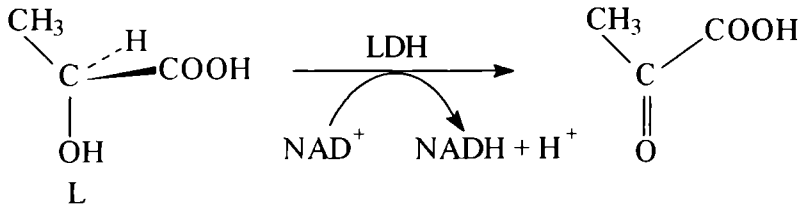
Astfel, α-D-glucozidaza (maltaza) hidrolizează legătura 1,4-α-D-glucozidică din maltoză, dar şi din alte substrate care conțin asemenea legătură (zaharoză). Invertaza (β-D-fructozidaza) scindează hidrolitic legăturile β-D-fructozidice din: zaharoză, rafinoză, genţianoză, stahioză.

4° Enzime cu stereospecificitate de substrat

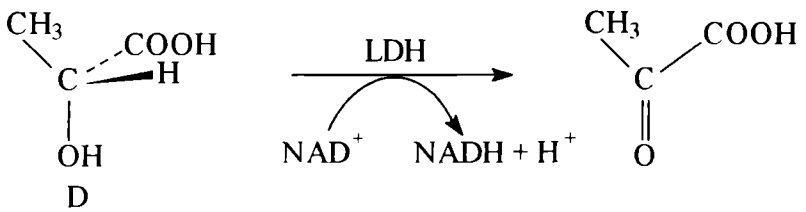
În această categorie sunt incluse enzimele care "recunosc" doar unul dintre izomeri (sterici sau structurali) ai substratului.

De exemplu, enzimele enantiospecifice catalizează reacţiile unuia dintre cei doi enantiomeri ai substratului racemic, ceea ce este foarte important pentru metabolism, majoritatea metaboliților fiind chirali, dar numai unul dintre enantiomeri fiind bioactiv.

Astfel, lactat dehidrogenaza (LDH) din muşchi şi din *Bacillus subtilis* catalizează reacţia de oxidare a acidului L(+)lactic la acid piruvic:



În scimb, enzima din *Lactobacillus plantarum* catalizează oxidarea acidului D(-)lactic:



Enatiospecificitatea unor enzime este folosită atât pentru scindarea unor racemici, dar şi pentru sinteza asimetrică totală a unor compuşi biologic – activi.

G. Importanța determinării de enzime în biochimia clinică

Dozările enzimelor se efectuează în serul bolnavilor şi servesc la controlul funcţiilor vitale ale organismului, ca şi la depistarea unor anomalii genetice sau dobândite pe parcursul vieții, ca rezultat al modificării metabolismului celular.

Există trei mecanisme principale prin care enzimele ajung în plasmă:

1° Prin secretarea lor mai ales în ficat, acționând asupra substratelor din plasmă: protrombina, lecitincolesterol aciltransferaza sau LCAT, colinesteraza sau CHE etc.

Reducerea activității plasmatice a acestor enzime indică o insuficiență funcțională a celulelor respective. Astfel, în cazul colinesterazei, scăderi importante ale nivelului acesteia sunt datorate cirozei hepatice sau intoxicațiilor cu compuşi organofosforici, în timp ce scăderile moderate indică denutriția, hipotiroidismul sau anemiile severe. Creşteri ale concentrației CHE se întâlnesc în afecțiuni ca: sindrom nefrotic, obezitate androidă etc.

2° Alte enzime sunt conținute în secreții exocrine (amilaza salivară şi pancreatică, lipaza pancreatică, fosfataza acidă prostatică etc.) şi se varsă în canalele excretoare, dar o cantitate mică

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

trece în limfă şi apoi în plasmă, unde prezenţa lor indică leziuni ale celulelor excretoare sau obstrucţii ale canalelor excretoare.

3° Enzimele intracelulare, la care se observă o creştere a concentraţiei lor în ser în cazul alterării membranelor celulare, ceea ce conduce la scurgerea acestor enzime în limfă şi plasmă: lactat dehidrogenaza (LDH), alanin aminotransferaza (ALAT), creatinkinaza (CK, CPK) etc.

De exemplu, creşteri marcate pentru LDH apar în cazul infarctului miocardic, al leziunilor toxice ale ficatului, în anemie megaloblastică, iar creşterile moderate indică: boli musculare, limfoame maligne, hemoliză.

În cazul creatinkinazei, infarctul miocardic şi distrofia musculară progresivă sunt semnalate de creşteri importante. Creşterile moderate apar în cazul injecţiilor intramusculare cu unele medicamente (diazepam, tetracicline).

II.3.6.5. Proteine de transport

Organismele sunt separate de mediul înconjurător prin membrane, care joacă atât rolul de barieră faţă de factorii externi de mediu cât şi de mediatori în schimburile de substanţe dintre compartimentele pe care le separă. Fenomenele de transport prin membrane reprezintă o condiţie esenţială a viabilităţii organismelor.

Transportul transmembranar controlează aspecte ale metabolismului celular ca: preluarea unor molecule din spaţiul extracelular, eliminarea produşilor catabolismului, polaritatea electrică a membranelor, expulzarea produşilor de secreţie etc.

O condiţie esenţială pentru funcţionarea celulei constă în aceea că substanţele care alimentează celula trebuie transportate prin membrane.

Membranele celulare semipermebile, constituite în principal din straturi fosfolipidice bimoleculare complexate cu proteine sub formă de lipoproteine, reprezintă o barieră în calea difuziei majorităţii substanţelor hidrosolubile prezente în fluidele intra- şi extracelulare.

Transportul prin membrane poate fi:

- pasiv, când are loc în sensul gradientului de concentraţie sau electrochimic, şi
- activ, împotriva gradientului electrochimic sau de concentraţie.

A. Transportul pasiv

Acesta prezintă două mecanisme: transport prin difuzie simplă şi transport facilitat.

A.1. Transportul prin difuzie simplă nemediată se observă la moleculele mici, nepolare, cu liposolubilitate ridicată, care pot traversa membrana hidrofobă.

Există şi excepţii constând în molecule mici hidrofile (apa, ureea), care deşi nu sunt liposolubile difuzează uşor prin stratul dublu fosfolipidic datorită existenţei unor pori hidrofili ai membranelor, cu dimensiuni potrivite pentru asemenea molecule.

În ceea ce priveşte electroliţii, deşi bistraturile lipidice membranare sunt greu penetrabile pentru speciile încărcate electric, membranele celulare prezintă o permeaţie specifică pentru ionii anorganici. Astfel, în membranele celulare epiteliale din intestinul subţire şi în alte membrane are loc transportul ionilor printr-un mecanism de schimb de ioni determinat de dimensiunile interstiţiilor din masa componentei proteice membranare şi de un mic exces de sarcini negative ale moleculelor acestor proteine.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

A.2. Difuzia simplă mediată implica un mecanism care a fost descifrat pe baza comportării unor molecule mici nemiscibile cu lipidele (ca apa) care penetrează membranele cu viteză foarte mare în ambele sensuri. Acest fenomen a fost confirmat prin existența ionoforilor.

Ionoforii (majoritatea biosintetizați de microorganisme sau obținuți prin sinteză chimică) sunt peptide ciclice (ca antibioticul valinomicina) sau liniare (ca gramicidina).

Rolul ionoforilor este acela de a proteja ionul transportat, pentru ca acesta să nu interacționeze direct cu componenta fosfolipidică a membranei.

Ionoforii pot fi (fig. II.18):

- cu rol de transportor mobil de ioni şi
- formatori de canale.

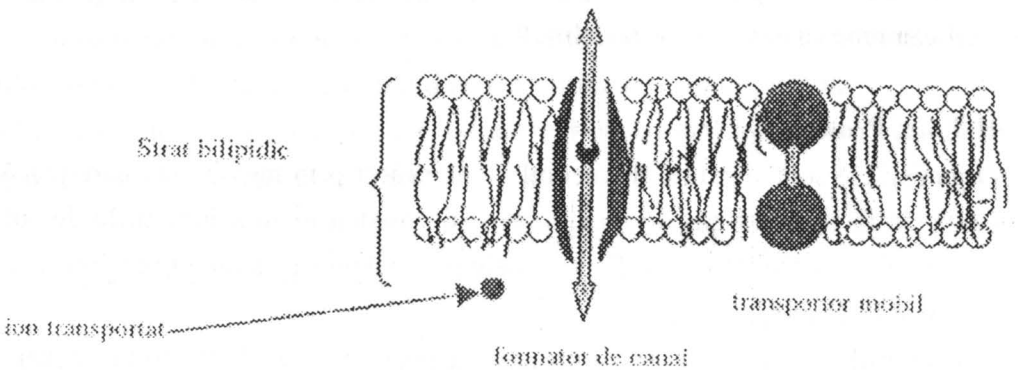


Fig. II.18 Tipuri de ionofori

Un exemplu de transportor mobil este valinomicina produsă de tulpini de *Streptomyces*, care fixează ionii de K^+ în partea centrală a moleculei, prin intermediul aminoacizilor centrali. Aceştia formează o cuşcă de protecție, orientându-se spre exterior cu părțile lor hidrofobe (radicalii hidrocarbonați) solubile în stratul dublu fosfolipidic celular (fig. II.19).

Complexul astfel format va difuza liber prin membrană în ambele sensuri, eliberând ionii K^+ pe fața membranei compartimentului cu concentrația mai redusă de K^+ (în sensul gradientului de concentrație).

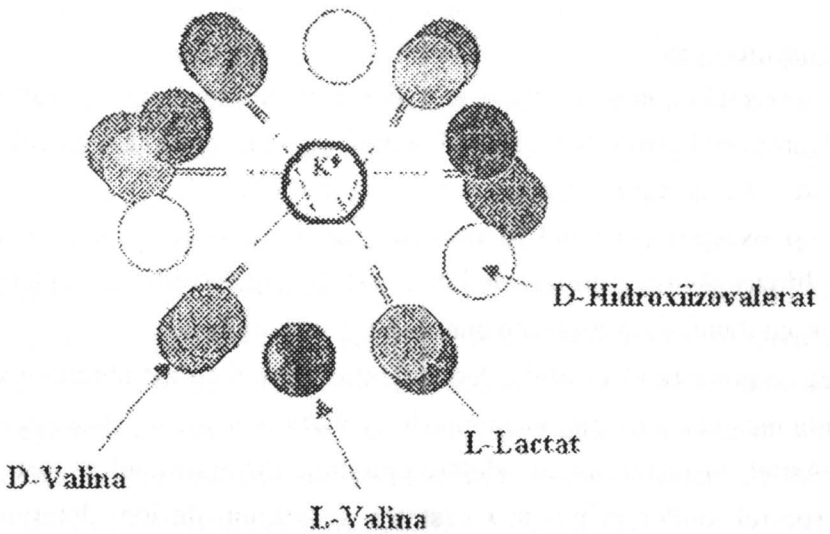


Fig. II.19 "Cuşca" de valinomicină pentru ionii K^+

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Din categoria ionoforilor formatori de canale face parte gramicidina A, peptidă liniară compusă din 15 aminoacizi.

Două molecule liniare de gramicidină A formează un canal transmembranar, prin care ionii monovalenți (H^+, K^+, Na^+) pot difuza cu o viteză foarte mare (20.000 cationi/canal/sec.).

Difuzia simplă poate fi mediată şi de proteinele canal. Acestea sunt proteine care formează în membranele celulare animale şi vegetale pori de dimensiuni mici, înalt-selectivi, care transportă ioni specifici ca: Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^- etc.

Canalele proteice pot fi permanent deschise sau pot fi canale "cu poartă", care se deschid sau se închid în funcție de factori ca: diferențe de potențial, prezența unor liganzi, stimuli mecanici etc.

Proteinele canal determină excitabilitatea neuronilor şi a celulelor musculare şi mediază semnalizări electrice din sistemul nervos, fiind prezente în toate organismele vii.

A.3. Difuzia facilitată are loc tot în sensul gradientului de concentrație şi fără consum energetic, dar se deosebeşte atât de difuzia simplă nemediată (este de până la 100.000 ori mai rapidă decât ar permite liposolubilitatea şi dimensiunea moleculelor) cât şi de difuzia mediată de proteine canal.

Difuzia facilitată prezintă unele caracteristici apropiate de cataliza enzimatică, pentru că transportul este efectuat printr-o proteină transportor din compoziția membranei sau legata de membrană, care "recunoaşte" substanța transportată şi-i accentuează difuzia. Când toate situsurile de legare ale proteinei transportoare sunt ocupate, se atinge viteza maximă (V_{max}) caracteristică pentru fiecare transportor. Cinetica este de tip Michaelis-Menten, transportul fiind înalt-selectiv.

După efectuarea transportului, conformația spațială a proteinei se reface conform unui mecanism "ping-pong", în care situsurile specifice de legare a substanței sunt expuse în exteriorul stratului fosfolipidic al membranei ("pong"). Apoi, aceleaşi situsuri sunt etalate pe fața internă ("ping") (fig. II.20). În acest mod sunt transportați neelectroliți ca: glucide, aminoacizi, acizi graşi cu lanțuri scurte etc.

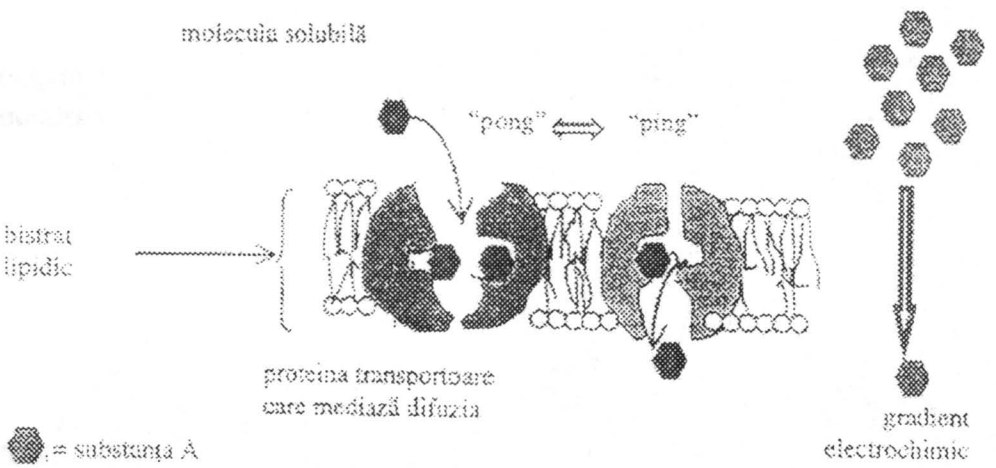


Fig. II.20 Mecanismul "ping-pong" al difuziei facilitate

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

B. Transportul activ

Acest fenomen consta în mişcarea ionilor sau a altor substanţe prin membrană, in combinaţie cu o proteină purtătoare, împotriva gradientului electrochimic şi de concentraţie, ceea ce implică un consum energetic, energia fiind furnizată în general de către ATP. Astfel, în eritrocitul uman, până la 50% din energia stocată în ATP este utilizată în scopul transportului membranar activ.

Existenţa la nivelul membranelor biologice a unor proteine transportoare capabile de a cupla procesele de transport împotriva gradienţilor electrochimici determină hidroliza ATP. Aceste proteine de tip ATP-azic care efectuează un lucru metabolic sunt denumite "pompe".

Toate pompele ionice de tip ATP-azic derivă dintr-o pompă proteică ancestrală, localizată în membrana plasmatică a celulelor procariote ancestrale.

În ordine evolutivă, ATP-azele sunt de trei tipuri: P, F, dintre care cele mai recente sunt ATPazele de tip P şi cele mai vechi – ATP-azele de tip V.

Pompele de tip P pompează specific ionii de Na^+, K^+, Ca^{2+}, H^+, fiind alcătuite din 1-2 lanţuri polipeptidice. Clasele F şi V sunt aproape întotdeauna pompe proteice de transport protonic, alcătuite dintr-un număr mare (3-13) de lanţuri polipeptidice.

Cea mai populară pompă ionică de tip P este $Na^+ - K^+$ – ATP-aza, izolată din celulele animale şi prezentă în toate celulele organismului. Această pompă stă la baza mecanismelor de transmitere a semnalelor prin sistemul nervos. Ea este responsabilă de menţinerea diferenţei de concentraţie a ionilor Na^+ şi K^+ prin membrana celulară, stabilind un potenţial electric negativ în celulă.

După cum se observă din fig. II.21, proteina globulară transportoare este formată din două subunităţi, cu M=45.000 şi M=100.000.

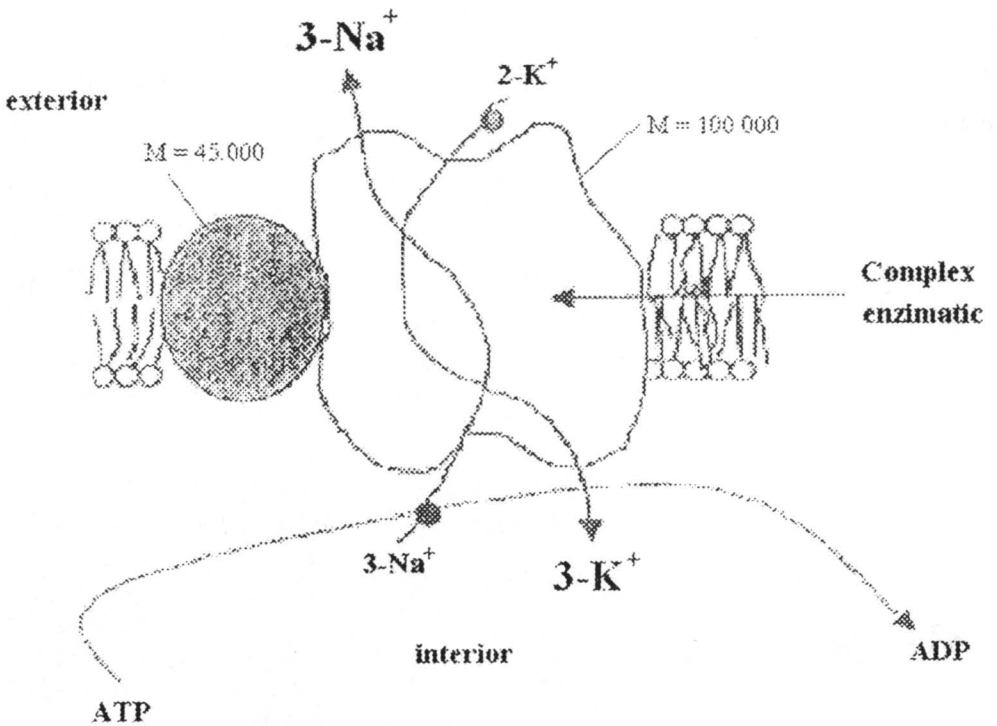


Fig. II.21 Schema pompei $Na^+ - K^+$

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Proteina mai mare are trei caracteristici:

- posedă trei părți receptoare pentru legarea ionilor Na^+ pe porțiunea sa din interiorul celulei;

- are două părți receptoare pentru ionii K^+ din exterior;

- porțiunea internă are activitate ATP-azică.

Funcția ATP-azică a proteinei este activată când în interiorul celulei se leagă trei ioni de Na^+ și în exterior – doi ioni de K^+.

Proteina va hidroliza ATP la ADP + P_i cu eliberarea energiei corespunzătoare legăturii macroergice din ATP. Sub influența acestei energii, proteina de transport se modifică conformațional, pompând ionii Na^+ în exterior și ionii K^+ în interiorul celulei, deși în exterior concentrația Na^+ este foarte mare, iar cea a ionului K^+ este mare în interiorul celulei.

Pompa de Na^+ – K^+ împiedică astfel umplerea celulelor cu apă și plesnirea lor, deoarece ionii Na^+ transportați în exterior antrenează cu ei moleculele de apă acumulate în exces în spațiul intracelular.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III. LIPIDE

Lipidele (grăsimile) sunt compuşi organici naturali, constituenţi ai materiei vii, cu dublu rol: substanţe nutritive de rezervă şi componenţi esenţiali ai membranelor celulare.

Compoziţia şi repartiţia lor prezintă variaţii legate de materialul biologic din care provin. Astfel, lipidele din celulele eucariote diferă de cele din celulele procariote; lipidele din tesutul adipos diferă de cele izolate din ţesutul cerebral etc.

În bacterii, grăsimile sunt distribuite în proporţie de 95% în membrană şi numai 5% în citoplasmă. Aceste lipide nu conţin resturi de steroli sau acizi graşi polinesaturaţi.

Pe de altă parte, în celulele vegetale este prezentă o mare varietate de acizi graşi polinesaturaţi; în funcţie de specie, plantele se caracterizează printr-o compoziţie constantă în lipide şi acizi graşi.

În organismele animale, lipidele sunt prezente în toate celulele, proporţia şi tipul de grăsimi prezentând variaţii în funcţie de natura ţesuturilor.

Compoziţia elementară a lipidelor include C, H, O şi uneori N, P, S. Moleculele lipidelor naturale conţin lanţuri hidrocarbonate liniare şi ramificate, saturate şi nesaturate, aciclice şi ciclice, care imprimă acestor compuşi un caracter hidrofob, lipofil (sunt insolubili în apă, dar solubili în solvenţi organici polari şi nepolari).

În lipidele mixte se întâlnesc şi resturi de acid fosforic, de amine, alcooli, glucide etc., care le imprimă acestora şi proprietatea de a fi parţial miscibile cu apa.

În materialele vegetale şi animale (lichide biologice, ţesuturi), majoritatea moleculelor lipidelor sunt legate de proteine (apolipoproteine), sub formă de complexe supramoleculare (lipoproteine), cu rolul de a mări solubilitatea lipidelor în mediul apos.

III.1. Clasificarea lipidelor după criteriul biologic

Importanţa deosebită a lipidelor este legată de principalele funcţii biologice pe care le îndeplinesc:

- sunt componente constitutive ale mebranelor;
- reprezintă forme de stocare şi transport al combustibilului metabolic;
- sunt parte din învelişul exterior al organismului, pe care-l protejează de acţiunea bacteriilor, plantelor, insectelor, animalelor;
- în calitate de componente ale suprafeţei celulare, sunt implicate în recunoaşterea celulară, în specificitatea de specie şi în imunitatea tisulară.

După rolul pe care îl joacă în organismele vii, lipidele se clasifică în: lipide de constituţie (structurale) şi lipide de rezervă.

III.1.1. Lipide de constituţie

Aceste lipide sunt substanţe complexe, prezente în citoplasma celulară, având un rol plastic şi contribuind la menţinerea integrităţii celulelor, în care se găsesc în proporţii şi concentraţii constante, independent de starea de nutriţie a animalelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Compoziția lipidelor plasmatice a fost determinată prin extracție selectivă cu solvenți. În organismele animale și la oameni, s-a evidențiat astfel existența mai multor compuși: trigliceride, fosfolipide, colesterol liber și esterificat, precum și fracțiuni mai mici, conținând lanțuri lungi de acizi grași liberi, care reprezintă aproximativ 5% din cantitatea totală de acizi grași din plasmă.

Dintre toți acești compuși prezenți în plasmă, doar fosfolipidele sunt cele mai polare, pe când restul substanțelor (deși înalt-energetice) sunt hidrofobe.

Transportul lor prin mediul apos al organismului uman este posibil datorită asocierii lipidelor insolubile cu fosfolipidele, urmată de complexarea lor cu proteinele, sub formă de lipoproteine. Pe această cale sunt transportate în sânge trigliceridele provenite din absorbția intestinală sau de la ficat, sub formă de chilomicroni și lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL). În mod asemănător, grăsimile eliberate din țesutul adipos sub formă de acizi grași liberi sunt transportate în plasmă, sub formă de complexe cu albumină.

Particulele complexelor lipoproteice au o formă aproximativ sferică, la suprafața lor fiind distribuite molecule cu grupe polare hidrofile (proteine, colesterol liber, fosfolipide). Aceste formează o anvelopă în jurul unui miez care conține esteri ai colesterolului și lipide hidrofobe. Legăturile dintre apolipoproteine și lipide se formează în bună măsură datorită structurii secundare α a proteinelor globulare. Aceste legături (cu excepția punților disulfurice) sunt de natură necovalentă, dar numărul lor mare conferă stabilitate complexelor supramoleculare lipoproteice

Lipoproteinele din plasma umană au fost sistematizate în funcție de proveniență (organ), densitate și compoziție (tabel nr. III.1). Ele au fost separate prin electroforeză și prin centrifugare separativă.

Tabel nr. III.1

Compoziția lipoproteinelor separate din plasma umană

Tipul de lipoproteine	Sursa	Densitate	Compoziția (%) din lipide totale						
			Proteine	Lipide totale	Trigliceride	Fosfolipide	Colesterol esterificat	Colesterol liber	Acizi grași liberi
Chilomicroni	Intestin	<0,96	1	99	88	8	3	1	-
VLDL	Ficat, intestin	0,96-1,006	7	93	56	20	15	8	1
LDL1	Ficat, intestin	1,006-1,019	11	89	29	26	34	9	1
LDL2		1,019-1,063	21	79	13	28	48	10	1
HDL1	Ficat și intestin	1,063-1,125	33	67	16	43	31	10	-
HDL2		1,125-1,210	57	43	13	46	29	6	6
Albumine-acizi grași	Țesut adipos	>1,281	99	1	0	0	0	0	100

III.1.2. Lipide de rezervă

Aceste grăsimi se acumulează cu precădere în țesuturile adipoase ale animalelor; nu se găsesc în membranele biologice și reprezintă un izvor de energie metabolică, deoarece se oxidează mult mai rapid decât glucidele și proteinele, eliberând cantități mari de energie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Valoarea calorică a lipidelor de rezervă este de peste două ori mai mare față de cea a glucidelor şi proteinelor, reprezentând forma cea mai concentrată a energiei potențiale, deoarece sunt asociate cu mai puțină apă. Cantități majoritare de lipide de rezervă se găsesc şi în grăsimile din lapte.

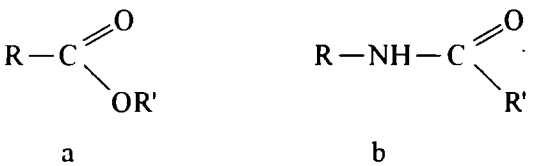
Lipidele de rezervă sunt trigliceride (lipide simple, homolipide) şi au origine exogenă (provin din alimentele ingerate) şi endogenă (ca rezultat al metabolizării glucidelor şi proteinelor introduse în organism).

În organismele animale, lipidele simple sunt stocate în adipocite (celule grase). Adipocitele, formate exclusiv din lipide, se deosebesc esențial de celelalte celule animale, care conțin cantități variabile de grăsimi dispersate în citoplasmă.

Țesutul adipos abundă în stratul subcutanat şi în cavitatea peritoneală. Cantitățile fiziologice (normale) de adipocite prezente în organismul uman sunt cuprinse între 21% (bărbați) şi 26% (femei).

III.2. Componente principale ale moleculelor lipidelor

În principal, în moleculele lipidelor pot apărea structuri de tip esteric (a) sau de tip amidic (b):



a b

III.2.1. Acizi graşi constituenți ai lipidelor

Surse biologice

Din materialele biologice au fost izolați peste 100 acizi graşi, care se caracterizează prin catene hidrocarbonate lungi, saturate sau nesaturate, conținând una sau mai multe duble legături sau (foarte rar) triple legături, acizi cu cicluri în catenă, hidroxi- şi cetoacizi.

Deoarece biosinteza acizilor graşi naturali decurge cu participarea unor unități conținând câte doi atomi de carbon (cu aportul acil-coenzimei A), aceşti acizi au în mod predominant un număr par de atomi de carbon în moleculă.

Dintre acizii graşi saturați, monocarboxilici, cu număr par de atomi de carbon în moleculă (C_{12} – C_{24}), predomină acidul palmitic ($C_{15}H_{31}COOH$) şi acidul stearic ($C_{17}H_{33}COOH$), iar dintre cei nesaturați – acidul oleic (tabel nr. III.2), dealtfel şi cel mai răspândit.

Acizii nesaturați izolați din lipidele naturale au configurația z (cis). În proporții mai mici se întâlnesc acizii polinesaturați, acizi cu cicluri în catenă, ceto- şi hidroxiacizi şi foarte rar – acizi cu triplă legătură.

Mai mult de 50% din acizii graşi conținuți în lipidele naturale sunt nesaturați. Acizii graşi apar în stare liberă în celule, în cantități mici, majoritatea lor aflându-se în formă combinată (esteri sau amide), ca părți constituente ale lipidelor saponificabile. În moleculele lipidelor apar uneori, în locul acizilor graşi, resturi de acid ortofosforic sau glucide care conțin resturi de acid sulfuric.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. III.2

Acizii graşi uzuali din surse biologice

Simbol*	Denumire		Structură	P.t. (°C)
	comună	sistematică		
I Acizi graşi saturaţi				
12:0	Acid lauric	Acid dodecanoic	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	44,2
14:0	Acid miristic	Acid tetradecanoic	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	52
16:0	Acid palmitic	Acid hexadecanoic	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	63,1
18:0	Acid stearic	Acid octadecanoic	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	69,6
20:0	Acid arahidonic	Acid eicosanoic	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	75,4
22:0	Acid behenic	Acid docosanoic	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	81
24:0	Acid lignoceric	Acid tetracosanoic	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	84,2
II Acizi graşi nesaturaţi (izomeri Z)				
16:1	Acid palmitoleic	Acid 9-hexadecenoic	$CH_3(CH_2)_5 - CH = CH - (CH_2)_7 - COOH$	-0,5
18:1	Acid oleic	Acid 9-octadecenoic	$CH_3(CH_2)_7 - CH = CH - (CH_2)_7 - COOH$	13,4
18:2	Acid linoleic (linolic)	Acid 9,12-octadecadienoic	$CH_3(CH_2)_4 - (CH=CH-CH_2)_2 - (CH_2)_6-COOH$	-9
18:3	Acid α-linolenic	Acid 3,6,9-octadecatrienoic	$CH_3CH_2 - (CH=CH-CH_2)_3 - (CH_2)_6-COOH$	-17
18:3	Acid γ-linolenic	Acid 6,9,12-octadecatrienoic	$CH_3(CH_2)_4 - (CH=CH-CH_2)_3 - (CH_2)_3-COOH$	
20:4	Acid arahidonic	Acid 5,8,11,14-eicosatetraenoic	$CH_3(CH_2)_4 - (CH=CH-CH_2)_4 - (CH_2)_2-COOH$	-49,5
20:5	EPA	Acid 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	$CH_3CH_2 - (CH=CH-CH_2)_5 - (CH_2)_2-COOH$	-54
24:1	Acid nervonic	Acid 15-tetracosenoic	$CH_3(CH_2)_7 - CH=CH-(CH_2)_{13} - COOH$	39

* Număr de atomi C: număr de duble legături

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În tabelul nr. III.2 sunt indicați acizii grași izolați frecvent din surse biologice.

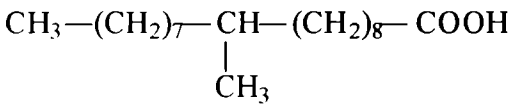
Există o mare varietate de lipide naturale, conținutul lor în acizi și alcooli cu diverse structuri depinzând de mediul din care provin:

- grăsimile plantelor terestre (fructe oleaginoase, semințe etc.) conțin în special acizi nesaturați (oleic și acizi polinesaturați);

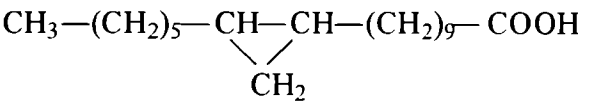
- grăsimile animalelor terestre conțin o cantitate mai mare de acizi saturați, mult acid oleic și cantități mai mici de alți acizi nesaturați;

- grăsimile animalelor și plantelor acvatice conțin mulți acizi nesaturați (inclusiv polinesaturați, cu mai mult de două duble legături) și o cantitate mai mare de acizi grași saturați;

- bacteriile nu conțin acizi grași di- și polinesaturați, în schimb conțin un număr restrâns de acizi mononesaturați și saturați, unii dintre ei având câteva ramificații (ca acidul tuberculostatic) sau chiar ciclici (acidul lactobacilic).



Acid tuberculostatic



Acid lactobacilic

Proporția unui anumit acid poate varia în limite largi (de la foarte mare în unele lipide la deloc în altele). De aceea, acizii unei grăsimi au fost grupați în două categorii:

- acizi grași principali (conținuți în proporție de peste 10%) și

- acizi grași secundari (conținuți în proporție de sub 10%).

Grasimile naturale pot fi clasificate și pe baza acestui ultim criteriu. Această clasificare coincide însă cu cea după proveniența biologică.

Grăsimile provenite din organisme înrudite biologic se aseamănă din punct de vedere chimic.

Acizii secundari pot fi caracteristici pentru o anumită grupă de grăsimi (acizii saturați cu molecule mici din lapte, ca acidul butiric).

În general, se observă că lipidele viețuitoarelor inferioare (bacterii, pești) au compoziție diferită și mai complexă, în comparație cu cele din organismele superioare (plante și animale terestre).

Acizii grași esențiali sunt necesari proceselor vitale ale organismelor animale superioare (și omului), dar nu pot fi sintetizați de acestea, fapt pentru care se procură din sursele vegetale de hrană.

Acizii linoleic (linolic) și α-linolenic, conținuți în cantități mari în plante, sunt asemenea acizi esențiali. Cel mai abundent în regnul vegetal este acidul linoleic. Acesta este un precursor din care mamiferele își biosintetizează acidul arahidonic (tabel nr. III.2). Acidul arahidonic (absent în organismele vegetale) este prezent în lipidele din ficat, în creier, în organele glandulare și în grăsimile de rezervă, apărând în lecitinele și cefalinele animale.

Carența în acizi grași esențiali produce tulburări grave, manifestate prin: întârzierea creșterii, dermatite, căderea părului, dereglări ale funcției reproducătoare etc. Din acest considerent, acizii grași esențiali au fost denumiți la început cu termenul de "vitamina F", la care s-a renunțat ulterior, deoarece compușii respectivi nu îndeplinesc condițiile impuse pentru clasa vitaminelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Acizii graşi esenţiali sunt componenţi ai fosfolipidelor, constituenţi de bază ai membranelor celulare, mitocondriilor şi ţesutului nervos; ei joacă şi rol de activatori ai unor enzime implicate în metabolismul lipidelor şi în alte procese metabolice.

De asemenea, acizii graşi esenţiali sunt şi precursori în sinteza prostaglandinelor (cu funcţii de hormoni), având remarcabile efecte în diverse activităţi fiziologice.

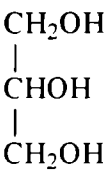
III.2.2. Alcooli constituenţi ai lipidelor

La alcătuirea moleculelor lipidelor participă alcooli de o mare diversitate structurală, putând fi mono- sau polihidroxilici, saturaţi sau nesaturaţi, aciclici sau ciclici, cu sau fără azot etc. Cei mai importanţi reprezentanţi ai alcoolilor graşi conţinuţi în lipide sunt: alcoolul cetilic (C_{16}), alcoolul stearilic (C_{18}), alcoolul carnaubic (C_{24}), alcoolul cerilic (C_{26}), alcoolul mircilic (C_{30}).

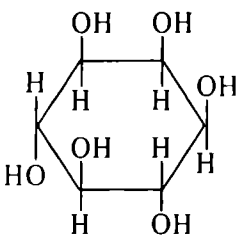
Alcoolii primari graşi, cu catenă liniară, sunt prezenţi în ceruri.

Dintre alcoolii graşi nesaturaţi se întâlneşte frecvent alcoolul oleilic (C_{18}). Glicerina (alcool trihidroxilic) reprezintă componenta de bază de la care derivă toate gliceridele şi fosfogliceridele.

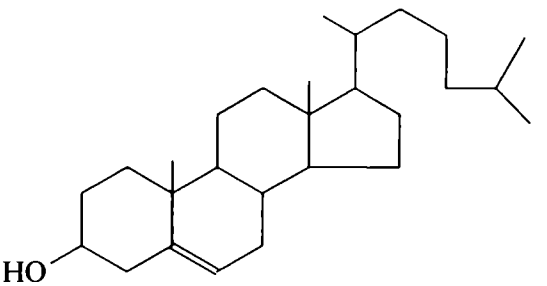
Mezoinozitolul (mioinozitolul), polialcool derivat de la ciclohexan, intră în compoziţia inozitolfosfatidelor, iar colesterolul (alcool steroidic) este componenta alcoolică a steridelor.



Glicerina

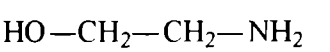


Mezoinozitol

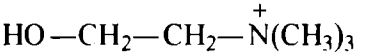


Colesterol

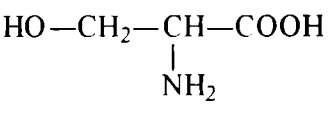
Aminoalcoolii prezenţi în lipidele naturale sunt reprezentaţi de: colamină (β-aminoetanol); colină (N-trimetil-β-aminoetanol); serină; sfingozină şi derivatul său – fitosfingozina, sau chiar de resturi de mono- sau oligoglucide:



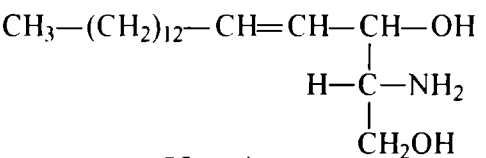
Colamina



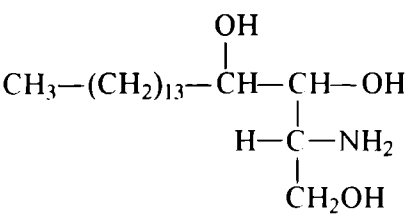
Colina



Serina



Sfingozina



Fitosfingozina

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aceşti alcooli pot fi întâlniţi în compoziţia lipidelor sub formă de esteri cu acizii graşi, esteri fosforici, esteri ciclici, amide.

III.3. Clasificare după criteriul chimic (structural)

După cum reiese din cele menţionate anterior, lipidele naturale pot fi clasificate după diverse criterii: funcţia biologică, sursa biologică, natura acizilor graşi principali din componenţa lor, comportarea la hidroliză.

Criteriul compoziţiei chimice fiind cel mai sistematic, va fi prezentat în cele ce urmează.

După structura chimică, există două clase importante de lipide: homolipide şi heterolipide (fig. III.1).

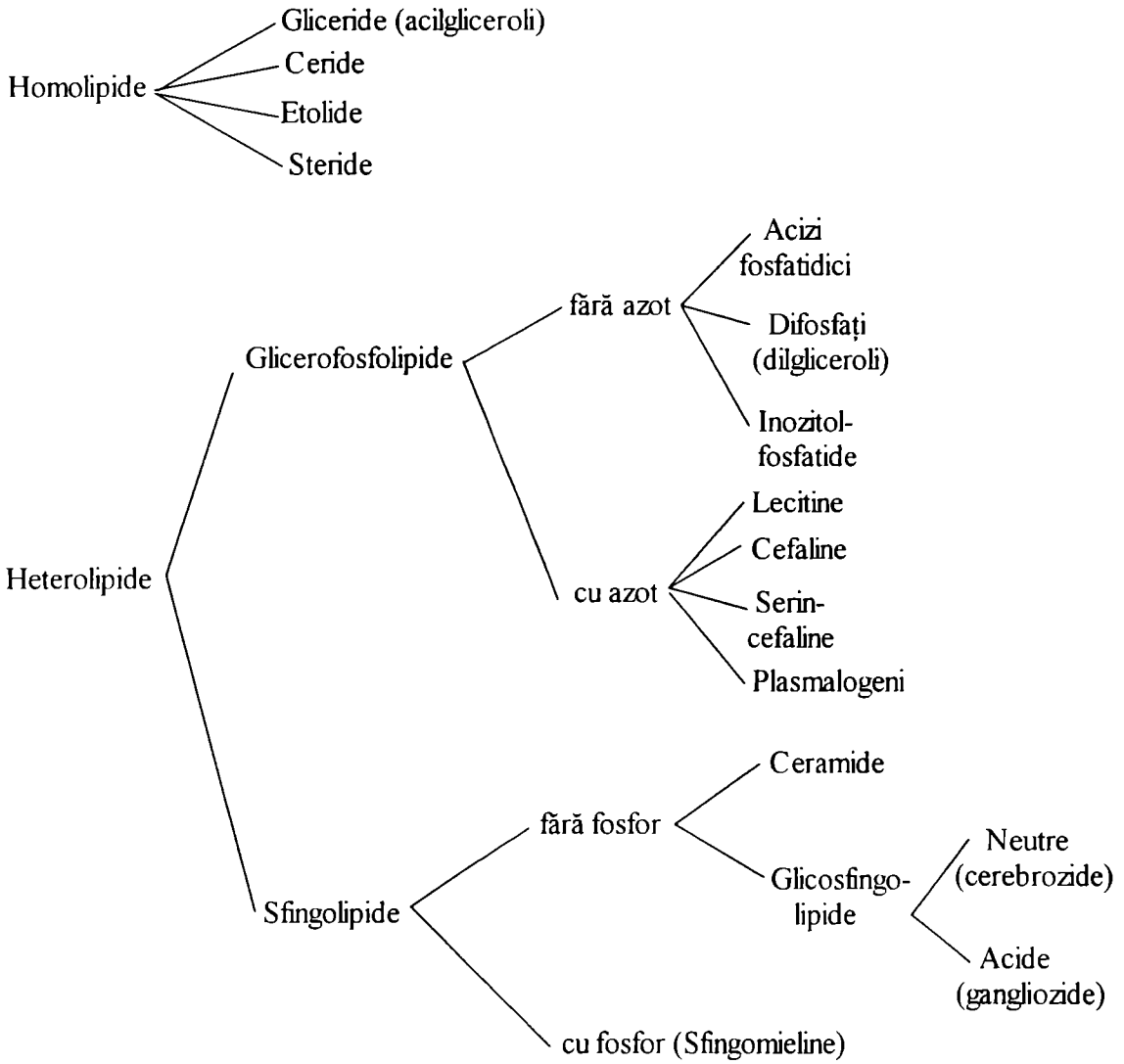


Fig. III.1 Clasificarea lipidelor după criteriul structurii chimice

Toate categoriilor de lipide din fig. III.1, alături de esterii sterolilor, pot fi considerate şi lipide saponificabile, deoarece pot fi hidrolizate chimic (în cataliză acidă sau bazică) sau enzimatic, conducând la componenţii din care sunt constituite: acizi graşi, acid fosforic, glicerină, sfingozină, inozitol, colină, colamină, colesterol etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În afară de aceste categorii, se mai includ în clasa grăsimilor şi "lipidele nesaponificabile" (care nu sunt scindate prin hidroliză chimică sau enzimatică la acizi graşi şi alcooli); ele însoţesc lipidele saponificabile, având un rol important atât în constituirea membranelor biologice, cât şi în metabolismul lipidelor: steroli, terpenoide, acizi graşi liberi, acizi biliari.

III.3.1. Homolipide

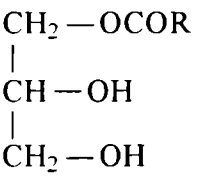
Aceste lipide se mai numesc şi grăsimi neutre, fiind substanţe ternare, cu molecula alcătuită numai din C, H şi O. Ele se găsesc sub formă de amestecuri, cel mai frecvent în plante şi animale.

III.3.1.1. Gliceride

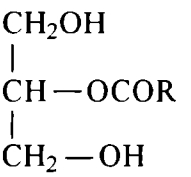
Gliceridele sunt lipide saponificabile, putând fi scindate hidrolitic.

În mod frecvent, ele mai sunt denumite şi acilgliceroli sau grăsimi neutre, fiind esteri ai glicerinei cu acizii graşi.

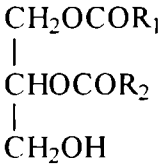
După poziţia şi gradul de substituţie ale grupelor OH, gliceridele pot fi: monogliceride (α sau β), digliceride (α, β sau α, γ) şi trigliceride:



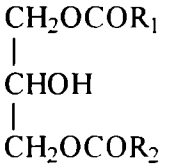
1(α) - Monogliceride



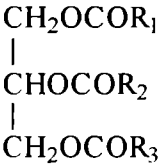
2(β) - Monogliceride



1,2(α,β) - Digliceride



1,3(α,γ) - Digliceride



Trigliceride

După natura radicalilor R_1, R_2 şi R_3 ai acizilor graşi, di- şi trigliceridele pot fi:

- gliceride omogene: $R_1 = R_2$, respectiv $R_1 = R_2 = R_3$;
- gliceride mixte: $R_1 \neq R_2$, respectiv $R_1 \neq R_2 \neq R_3$.

Gliceridele sunt prezente în absolut toate organismele vii, în special trigliceridele. Mono- şi digliceridele apar în cantităţi mici, ca intermediari în metabolismul trigliceridelor.

În plante, trigliceridele sunt distribuite în toate ţesuturile şi organele, cantităţi însemnate fiind prezente în pulpa unor fructe şi mai ales în seminţe. Conţinutul şi compoziţia lor în uleiurile vegetale depind de: specie, regiune geografică, anotimp, condiţii pedoclimatice, stadiu de dezvoltare. Astfel, plantele din regiunile sudice conţin uleiuri mai sărace în acizi graşi nesaturaţi, în comparaţie cu plantele din regiunile nordice. Seminţele şi fructele au un conţinut de ulei mai bogat în perioada coacerii, de obicei toamna, ajungând în unele cazuri la proporţii de până la 70%.

Uleiurile şi grăsimile din materialele vegetale sunt însoţite de regulă de alte substanţe (acizi graşi liberi, steroide, pigmenţi, vitamine, uleiuri eterice, fosfatide etc.). Componentele cu

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

caracter hidrofil ale acestor amestecuri nu sunt volatile până la 100°C şi nu sunt hidrolizabile, reprezentând partea nesaponificabilă a grăsimilor.

Gliceridele plantelor se găsesc de obicei sub formă de amestecuri de trigliceride mixte, care se clasifică (după consistenţă) în uleiuri şi grăsimi vegetale.

- În uleiuri, predomină grupele acil provenite din acizii graşi nesaturaţi, ceea ce face ca aceste gliceride să se prezinte sub formă de lichide, cu vâscozităţi diferite.

- În grăsimile vegetale, în schimb, trigliceridele mixte conţin un procentaj mai ridicat de grupe acil provenite de la acizii graşi saturaţi; aceste produse prezintă o consistenţă mai ridicată.

Gliceridele prezente în drojdii şi bacterii sunt, la rândul lor, amestecuri care diferă de la un tip de microorganism la altul.

Lipidele de orgine animală conţin cantităţi mari de gliceride, în special trigliceride mixte. Acestea intră în alcătuirea tuturor celulelor şi ţesuturilor organismului animal şi se clasifică – după localizare şi funcţia biologică – în: gliceride de rezervă şi gliceride de constituţie (III.1).

Gliceridele de rezervă sunt stocate în ţesutul adipos şi în ficat. Între trigliceridele şi acizii graşi mobilizaţi din ţesutul adipos şi trigliceridele sintetizate în ficat şi încorporate în VLDL există un transfer permanent, bidirecţional.

Gliceridele de constituţie (structurale) sunt componente ale celulelor, prezente într-o proporţie mai mică decât gliceridele de rezervă. În celule, gliceridele structurale se află ataşate unor formaţiuni sau structuri celulare ca: membrane celulare, particule subcelulare etc. În ţesuturi ca: ficatul, rinichiul, glanda mamară, mucoasa intestinală, este biosintetizat glicerol-3-fosfatul, prin fosforilarea directă a glicerinei sub acţiunea glicerokinazei din aceste ţesuturi.

În muşchi sau în ţesutul adipos, în care glicerokinaza este absentă sau în cantitate redusă, glicerol-3-fosfatul se obţine din dihidroxiaceton-fosfat (produs intermediar al glicolizei).

Împreună cu acizii graşi (proveniţi din alimentaţie sau prin mobilizarea lor din ţesutul adipos, sau prin sinteză endogenă in ficat), glicerol-3-fosfatul reprezintă un precursor în biosinteza endogenă a trigliceridelor. Această biosinteză are loc cu participarea acil-CoA, provenită atât din metabolismul glucidelor cât şi din cel al aminoacizilor.

Sinteza de trigliceride pe seama hidraţilor de carbon (glucidele) este deosebit de accentuată în cazul unui regim alimentar bogat în produse zaharoase, ceea ce explică apariţia unor forme de hipertriglicerimie, rezultat al mobilizării enzimelor cu rol în sinteza hepatică a trigliceridelor.

Consistenţa trigliceridelor animale depinde de natura acizilor graşi din grupele acil. Astfel, când toţi radicalii acil provin de la acizi graşi saturaţi, lipidele vor fi solide, iar un conţinut mai mare de radicali acil nesaturaţi le va imprima o consistenţă semisolidă sau uleioasă.

Pricipalii acizi graşi saturaţi din componenţa gliceridelor animale sunt acizii palmitic şi stearic. Dintre acizii nesaturaţi, este prezent în special acidul oleic, alături de cantităţi mai mici de acid palmitoleic şi acid linoleic.

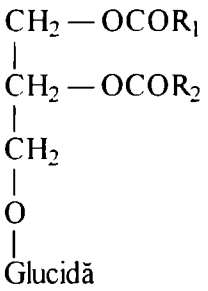
Deoarece sunt amestecuri de trigliceride, grăsimile animale nu au un punct de topire fix, ci prezintă la încălzire fenomenul de "înmuiere", pe un interval de temperatură. Cele solide (seul de bou, untul de vacă etc.) prezintă fenomenul "topirii duble", datorită existenţei a trei forme cristaline polimorfe.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Trigliceridele sunt insolubile în apă, în care pot forma emulsii (dispersii coloide), stabilizate prin adăugarea unor emulgatori (agenți tensioactivi) ca săpunul și detergenții. Ca și alte lipide, trigliceridele sunt liposolubile; ele se dizolvă în solvenți organici ca: benzină de extracție, eter de petrol, benzen, toluen, cloroform, tetraclorură de carbon, tricloretilenă, sulfură de carbon, eter etilic, acetonă etc.

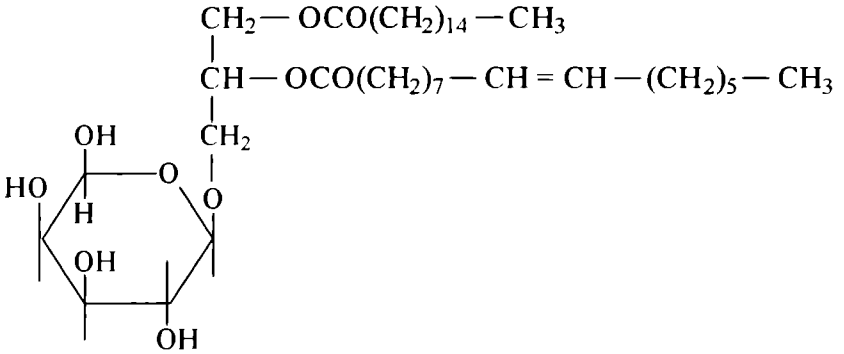
III.3.1.2. Glicozilacilgliceroli

În moleculele glicozilacilglicerolilor, două grupe OH ale glicerinei sunt esterificate cu acizi grași superiori, în timp ce a treia grupă este eterificată cu hidroxilul β-glicozidic al unei glucide (mono-, di- sau triglucidă):



Acești compuși pot fi considerați ca fiind glicozide, în care agliconul este reprezentat de un rest de diacilglicerol (sau chiar de un rest glicolipidic).

De exemplu, β-D-galactozil-diacilglicerolul se găsește în țesutul nervos al vertebratelor și în plantele superioare. Substanțe asemănătoare ca structură au fost identificate și în bacterii:



β-D-Galactozildiacilglicerol

III.3.1.3. Ceride

Constituind o clasă de compuși naturali cu răspândire largă, ceridele sunt esteri ai acizilor grași saturați cu alcoolii monohidroxilici primari superiori. Atât catenele hidrocarbonate ale acizilor cât și cele ale alcoolilor sunt liniare.

Acizii grași din componența cerurilor, cu o frecvență mai mare în natură, sunt: acidul miristic, acidul palmitic, acidul stearic, acidul lignoceric și acidul cerotic (C_{26}).

Dintre alcoolii grași, cei mai des întâlniți sunt: alcoolul cetilic (C_{16}), alcoolul carnaubic (n-tetracosilic, C_{24}), alcoolul cerilic (n-hexacosilic, C_{26}), alcoolul miricilic (triacontan-1-ol, C_{30}) și alcoolul melisilic (C_{31}).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cerurile naturale sunt întotdeauna amestecuri de esteri şi cantităţi variabile de alcani, alcooli liberi şi acizi liberi.

Investigarea compoziţiei cerurilor şi evidenţierea componentelor acestora s-au realizat prin metode fizice (analiză termică, difracţie cu raze X etc.).

Ceridele naturale sunt substanţe solide, cu temperaturi de topire relativ joase (50-80°C), de culoare alb-gălbuie şi cu aspect unsuros. Nu prezintă fenomenul de râncezire şi sunt nemiscibile cu apa, dar miscibile cu solvenţi organici. Cerurile se găsesc atât în regnul animal cât şi în cel vegetal, formând un strat superficial de protecţie.

Astfel, cerurile de pe blana animalelor le protejează împotriva apei. În cazul plantelor, cerurile sunt plasate pe suprafaţa frunzelor, florilor şi fructelor, împiedicând evaporarea apei şi având un rol de protecţie faţă de acţiunea luminii şi căldurii excesive, ca şi a unor microorganisme.

S-au izolat ceruri şi din celulele şi ţesuturile interne ale plantelor, unde se găsesc sub formă încrustată (în fibrele de in şi de cânepă), precum şi din unele microorganisme (*Arthrobacterii*).

- Ceara de albine este un amestec de esteri ai alcoolilor din seria $CH_3(CH_2)_n - OH$ (cu: $C_{24, 26, 28, 30, 32, 34}$) cu acizii din seria $CH_3(CH_2)_nCOOH$, cu $C_{24} - C_{34}$ şi alcani de forma $CH_3(CH_2)_2CH_3$, cu $C_{25, 27, 29, 31}$.

- Ceara de bumbac conţine esteri de la aceiaşi alcooli şi acizi întâlniţi şi în ceara de albine.

- Ceara montană (fosilă) a fost izolată din unele varietăţi de cărbune brun şi are o compoziţie asmănătoare cu cerurile prezentate mai înainte.

- Există şi ceruri vegetale cu un conţinut ridicat de alcani liberi, sau chiar formate exclusiv din amestecuri de alcani. De exemplu, ceara din frunzele de tutun conţine doar alcanii cu $C_{29,31,33}$, ca şi ceara de pe frunzele de varză (95% C_{29} şi 5% C_{31}).

- În animalele superioare, cerurile sunt puţin întâlnite. De exemplu, din capul şi slănina caşalotului s-a izolat o ceară solidă (walrat, spermaceti) şi o ceară lichidă (ulei de spermaceti). Walratul conţine în majoritate esterul acidului palmitic cu alcoolul cetilic (C_{16}), iar uleiul de walrat este un amestec de esteri ai acizilor saturaţi cu $C_{12, 14, 16}$ cu alcoolul oleic.

- O compoziţie diferită o are grăsimea de pe lâna de oaie (lanolina) – degras –, care se obţine din lână, prin extracţie cu solvenţi sau prin spălare cu săpun. Aceasta este un amestec de părţi aproximativ egale de esteri, alcooli liberi şi acizi liberi.

Acizii izolaţi fac parte din patru serii omoloage diferite:

- acizi cu catenă normală şi număr par de atomi de carbon ($C_{10} - C_{26}$);

- acizi cu catenă ramificată şi cu grupa $\begin{matrix} CH_3 \\ \diagdown \\ \quad CH- \\ \diagup \\ CH_3 \end{matrix}$ marginală ($C_{10} - C_{28}$);

- acizi cu catena ramificată şi cu atomii de carbon asimetrici (dextrogiri) şi număr impar de atomi de carbon ($C_9 - C_{31}$), având la capătul catenei grupa $\begin{matrix} CH_3 \\ \diagdown \\ \quad CH- \\ \diagup \\ CH_3 \end{matrix}$;

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- α-hidroxiacizi de forma $CH_3(CH_2)n-\underset{\underset{OH}{|}}{CH}-COOH$ optic activi, cu număr par de atomi de carbon ($C_{12} - C_{18}$).

La rândul lor, alcoolii izolați din lanolină sunt:

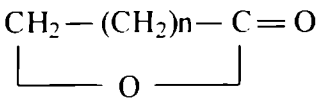
- alcooli cu catenă normală și număr par de atomi de carbon ($C_{18} - C_{26}$);
- alcooli secundari și alcooli inferiori, optic activi, cu structură incomplet elucidată;
- alcooli din clasa steroidelor, în special colesterol.

Proprietățile fizice (mai ales punctul de solidificare) ale cerurilor sunt determinate atât de raportul cantitativ al substanțelor din amestec, cât și de lungimea catenei alcoolilor și acizilor care formează esterii. Cu cât aceștia au catenă mai lungă, cu atât punctul de topire este mai ridicat. Astfel, walratul (în care predomină resturi de acizi și alcooli grași relativ inferiori, cu C_{16}) are p.t. = 41 – 48°C. Ceara de albine (cu conținut ridicat de acid palmitic) are p.t. = 60 – 62°C.

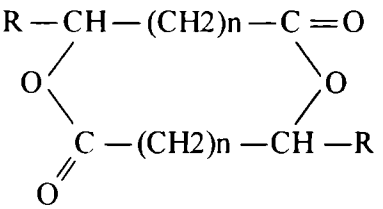
Ca și în cazul altor compuși din clasa lipidelor, prezența dublelor legături în moleculele ceridelor (ca esteri ai acidului oleic sau ai alcoolului oleilic), conduce la scăderea p.t., asemenea ceruri fiind lichide (uleiul de walrat).

III.3.1.4. Etolide

Această categorie de homolipide cuprinde eteri ciclici (lactone) derivați de la hidroxiacizi cu catenă lungă, având structură de mono-, di- sau polilactone.



Monolactonă



Dilactonă

Monolactonele se formează printr-o esterificare intramoleculară, iar di- și polilactonele – prin esterificare intermoleculară. De cele mai multe ori, la formarea etolidelor participă 3 – 5 molecule de hidroxiacizi.

Deoarece la închiderea ciclurilor participă toate grupele – COOH și – OH din moleculele hidroxiacizilor, în etolide nu sunt prezente aceste grupe funcționale, în stare liberă.

Cel mai frecvent se întâlnesc în structura etolidelor resturi de acid sabinic (12-hidroxilauric) și acid juniperic (16-hidroxipalmitic):

$HO-CH_2-(CH_2)_{10}-COOH$ Acid sabinic

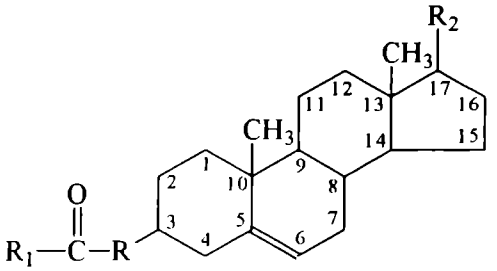
$HO-CH_2-(CH_2)_{14}-COOH$ Acid juniperic

Etolidele constituie o categorie aparte a cerurilor vegetale, fiind componente principale aale cerurilor de conifere, unde se află în amestec cu acizi grași superiori.

III.3.1.5. Steride

Steridele sunt esteri ai sterolilor cu acizii grași superiori, care rezultă prin acilarea sterolilor la grupa OH din poziția 3.

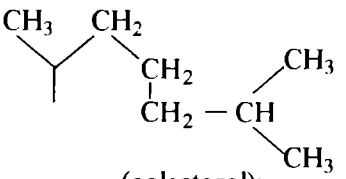
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



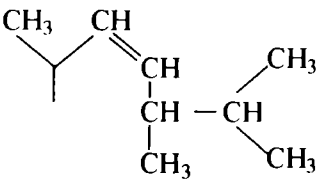
Steridă

R_1C(=O) = rest acil de la acizii: palmitic, stearic, oleic, linoleic:

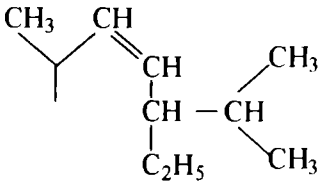
R_2 =



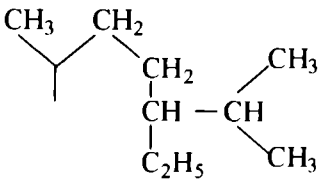
(colesterol);



(ergosterol);



(stigmasterol);



(β-stigmasterol)

etc.

Sterolii sunt alcooli cristalizați, care se găsesc liberi (vezi III.4.3.1) sau esterificați cu acizi grași în lipidele tuturor plantelor și animalelor.

În funcție de radicalul acil ($R_1-C(=O)-$) și de radicalii R_2 din poziția 17, ca și de gradul de nesaturare introdus în scheletul de bază, ciclopentanoperhidrofenantrenic, al sterolilor, rezultă o gamă variată de derivați din clasa steridelor, care se clasifică după sursa din care provin în: zoosteroli, fitosteroli, micosteroli, steroli marini.

Cel mai răspândit este colesterolul, prezent în toate țesuturile organismului animal, în special în: creier, nervi, glanda suprarenală, ca și în: gălbenușul de ou, lapte și în cerurile de pe părul (blana) animalelor (în lanolină). Astfel, creierul conține 17% colesterol, în cea mai mare parte neesterificat, iar serul sanguin uman – 0,15-0,25g/100cm^3 colesterol total.

În patologia umană, dozarea colesterolului seric are importanță în special în diagnosticarea hiperlipoproteineinemiilor (III.5.1).

Într-un ser normal, aproape două treimi din colesterol este esterificat. Raportul colesterol esterificat/colesterol total este influențat de activitatea colesterol – esterazei hepatice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III. 3.2. Heterolipide (lipide complexe)

Heterolipidele se caracterizează prin faptul că, pe lângă C, H şi O, conţin şi alte elemente (N, P, S). Ele sunt lipide structurale, absente în grăsimile de rezervă.

Lipidele complexe se clasifică în funcţie de natura alcoolului de la care derivă, în:

- glicerofosfolipide (derivaţi ai glicerinei) şi
- sfingolipide (derivaţi de la sfingozină).

Moleculele heterolipidelor sunt alcătuite din două părţi: o parte nepolară, hidrofobă (lipofilă), formată din acilglicerină şi esteri ai glicerinei sau sfingozinei cu acizii graşi saturaţi şi nesaturaţi şi o parte polară, hidrofilă (lipofobă), formată din resturi de fosfat şi alcooli (glicerină, sfingozină), de aminoalcooli (colină, colamină) de serină etc.

Rolul biologic principal al fosfolipidelor este cel de participante la structurarea membranelor, sub formă de complexe lipoproteice, alături de colesterol. În tabelul nr. III.3 sunt indicate cele mai frecvente lipide din membranele biologice.

Tabelul nr. III.3

Lipide prezente în membrane

Tipul de lipide	Membrană plasmatică hepatocit	Membrană eritrocit	Mielină	Reticul endoplasmatic	Membrană mitocondrială	Membrană *E. coli*
Colesterol	17	23	2	6	3	0
Fosfatidil-coline	24	17	10	40	39	0
Fosfatidil-colamine	7	18	15	17	35	70
Fosfatidil-serine	4	7	9	5	2	urme
Sfingomieline	19	18	8	5	0	0
Glicolipide	7	3	28	urme	urme	0
Altele	22	13	8	27	21	30

III.3.2.1. Glicerofosfolipide (Fosfogliceride)

Această categorie de lipide este formată în principal din:

- glicerofosfolipide fără azot şi
- glicerofosfolipide cu azot.

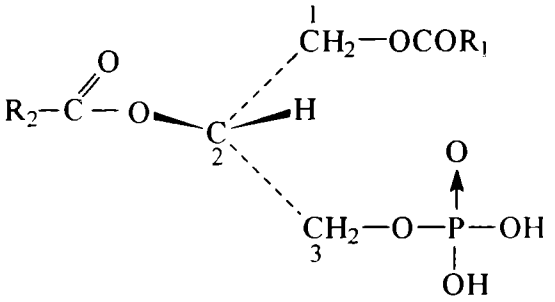
A. Glicerofosfolipide fără azot

În această subclasă intră totalitatea glicerofosfolipidelor care, în partea polară, nu conţin substanţe cu azot aminic legate de restul fosfat din acidul fosfatidic.

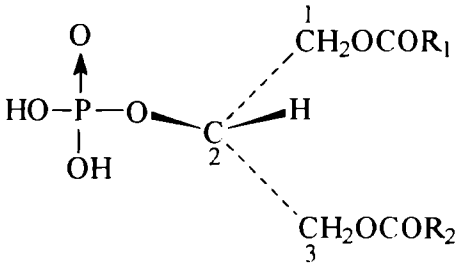
A.1. Acizi L-fosfatidici

Aceşti acizi corespund unor formule structurale α şi β:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Acid α-L-fosfatidic



Acid β-L-fosfatidic

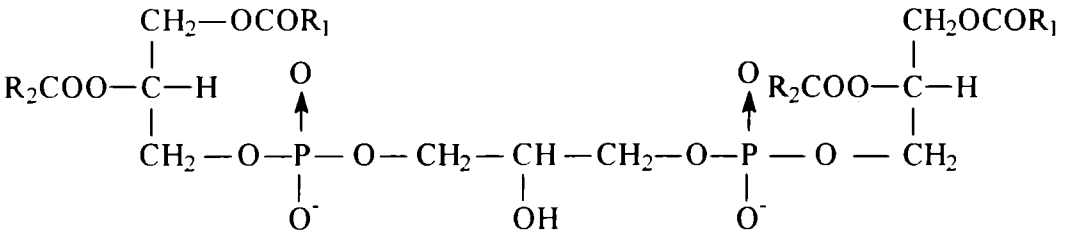
R_1 şi R_2 sunt resturi de acizi graşi saturaţi (palmitic, stearic) şi, respectiv, nesaturaţi (cu C_{16-20}), în special acid oleic.

Izomerii naturali sunt acizii α-fosfatidici liberi sau combinaţi, optic activi, aparţinând familiei (seriei) sterice L, care au – de regulă – radicalii acil saturaţi în poziţia 1 a restului de glicerină şi nesaturaţi – în poziţia 2.

Asemenea acizi fosfatidici, care reprezintă de fapt scheletul de bază de la care derivă toate celelalte glicerofosfolipide, apar în cantităţi mici în celulă, ca intermediari în biosinteza enzimatică a acestora.

A.2. Difosfatidilgliceroli

Aceşti compuşi se mai numesc şi cardiolipide sau cardiolipine; ei sunt substanţe naturale rezultate prin esterificarea a două molecule de acid α-L-fosfatidic cu grupele hidroxi din poziţiile 1 şi 3 ale glicerinei.



Difosfatidilglicerol

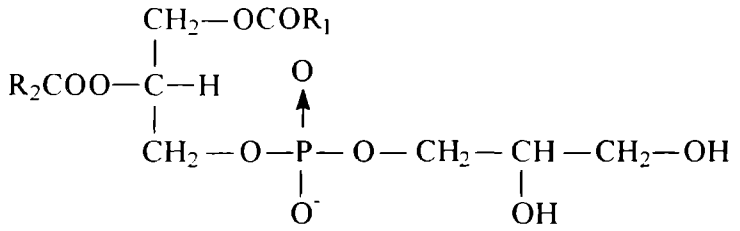
În catena principală a difosfatidilglicerolilor există trei resturi de glicerină, unite între ele prin două punţi fosfodiesterice. Celelalte două grupe OH ale fiecărui rest de glicerină sunt esterificate cu acizi graşi. Membrii acestei subclase se deosebesc între ei prin natura radicalilor R_1 şi R_2 din moleculă.

Difosfatidilglicerolii sunt prezenţi în ţesuturile plantelor şi animalelor şi abundă în membranele celulelor bacteriene. Astfel, cantităţi însemnate de cardiolipină se găsesc în membrana internă a mitocondriilor. De asemenea, a mai fost izolată şi din membranele cloroplastelor.

Denumirea sa se datorează faptului că, iniţial, cardiolipina a fost izolată din muşchiul inimii, în care se găseşte în cantităţi mai mari. Cardiolipina este singurul fosfatidilglicerol cu proprietăţi imunologice şi se utilizează la diagnosticarea serică a sifilisului.

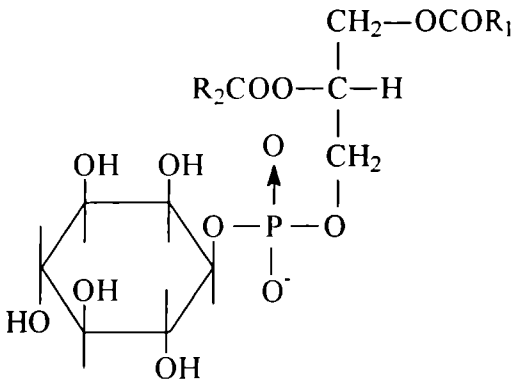
Substanţe similare cardiolipinei au fost identificate în plante. Acestea sunt monofosfatidil-gliceroli, care conţin în moleculă un rest de acid fosfatidic şi unul de glicerină, legate pritr-o punte fosfodiesterică:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



A.3. Inozitolfosfatide (Fosfatidilinozitoli)

În inozitolfosfatide, acidul fosfatidic este esterificat cu mezoinozitol:



; R_1 = radicali proveniți de la acizi graşi superiori

Inozitolfosfatidă

Fosfatidilinozitolii au caracter acid datorită grupei fosfodiesterice din moleculă. Ei se găsesc în organismele animale şi vegetale şi în microorganisme.

Cantități însemnate de fosfatidilinozitoli, în amestec cu derivații lor mono- şi di-fosforilați la grupele OH din pozițiile 4 şi respectiv, 4,5 ale restului de inozitol, se găsesc în creier. Numărul resturilor de fosfat din moleculă conferă acesteia un număr egal de sarcini negative. De aceea, inozitolfosfatidele participă la transportul cationilor prin membrane, proces foarte important pentru funcția nervoasă. În cantități mai mici, fosfatidilinozitolii mono- şi difosforilați se găsesc şi în alte organe.

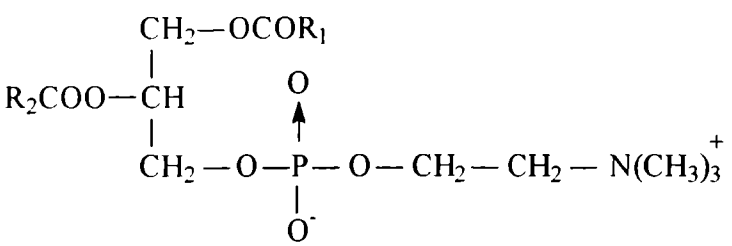
Fosfatidilinozitolii sunt larg răspândiți şi în regnul vegetal. Astfel, ei au fost izolați din: fasole soia, arahide, germeni de grâu, boabe de porumb, grâu şi mazăre, semințe de in etc.

B. Glicerofosfolipide cu azot

Această subclasă cuprinde: lecitinele, cefalinele, serincefalinele şi plasmalogenul.

B.1. Lecitinele

Lecitinele sunt esteri ai acizilor L-fosfatidici cu aminoalcoolul colina (fosfatidil-coline):



α-Lecitină

În lecitinele naturale, R_1 este un radical de acid gras saturat (palmitic sau stearic), iar R_2 derivă de la acizi carboxilici nesaturați (oleic, linoleic, arahidonic).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În unele cazuri, R_1 şi R_2 sunt nesaturaţi. De asemenea, s-a observat ca circa 40% din fosfatidilcolina pulmonară conţine resturi palmitoil atât la C_1 din glicerină, cât şi la C_2 ($R_1=R_2=C_{15}H_{31}$). Acest lucru se explică prin faptul că fosfatidilcolina din ţesutul pulmonar reprezintă componentul major care împiedică colapsul plămânului în momentul expiraţiei. Deficienţa sa este responsabilă de apariţia sindromului de colaps respirator la copiii prematuri.

Lecitinele naturale sunt α-lecitine, derivate de la acidul α-fosfatidic, dar în timpul izolării lor se pot forma şi β-lecitine izomere, prin migrarea grupei fosforilcolinice din poziţia 3 (α) în poziţia 2 (β) a restului de glicerină.

Lecitinele sunt substanţe de culoare albă, cu aspect ceros, foarte higroscopice; se închid la culoare prin expunere la aer şi formează compuşi cristalini cu multe săruri anorganice, în special cu clorura de cadmiu. Sub acţiunea unor enzime specifice, lecitinele pot fi scindate hidrolitic. Astfel, fosfataza A_2 (din veninul şerpilor şi scorpionilor) scindează grupa carboxi esterică din β, eliberând lizolecitina şi un acid gras superior.

Spre deosebire de lecitine (care asigură integritatea membranelor celulare), lizolecitinele au o puternică acţiune hemolitică, acţionând negativ asupra permeabilităţii membranelor eritrocitelor (sunt otrăvuri ale sângelui).

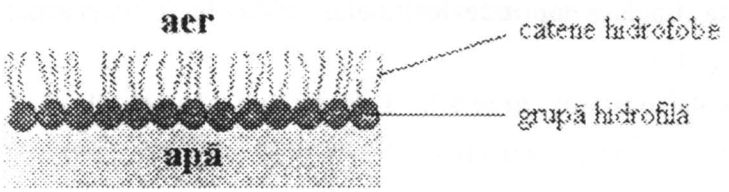
Cantităţi mici de lizolecitine au fost izolate şi din ciuperci, microorganisme şi seminţele unor plante (grâu, orez, secară etc.).

Colinfosfogliceridele, ca şi colaminfosfogliceridele se găsesc în cantităţile cele mai abundente în plantele şi animalele superioare. Cele două tipuri de fosfolipide sunt corelate metabolic, fiind majoritare în membranele animale. În sursele naturale (plante şi animale superioare) glicerofosfolipidele sunt conţinute sub formă de lipoproteine.

Concentraţia lor variază în funcţie de organul din care provin: creier (7%), măduva osoasă (5%), ficat (3-4%), gălbenuş de ou (10%). Se mai găsesc în cantităţi apreciabile în embrionii seminţelor plantelor leguminoase şi în cereale.

Lecitinele sunt substanţe amfifilice sau amfipatice în care partea hidrofobă este regiunea provenită de la diacilglicerol, iar cea hidrofilă este restul de fosforil-colină sau fosforil-colamină (în cazul cefalinelor).

Lecitinele sunt ioni dipolari, care la pH fiziologic normal se găsesc sub formă de amfiioni.



O proprietate importantă a amfifililor este aceea de a forma micelii în mediu apos. Miceliile (agregate globulare sau cilindrice) se formează dacă în amestecul apă – amfifil concentraţia ultimului depăşeşte o anumită valoare, numită concentraţia micelară critică (cmc) diferită de la un amfifil la altul şi depinzând de condiţiile de solubilizare (fig. III.2a).

Alţi amfifili adoptă în aceleaşi condiţii un aranjament bistratificat, sub formă de structură lamelară, în care grupele hidrofile sunt expuse în faza apoasă (fig. III.2b). Acest lucru se întâmplă în cazul în care densitatea lipidelor este apropiată de cea a mediului de dispersie.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

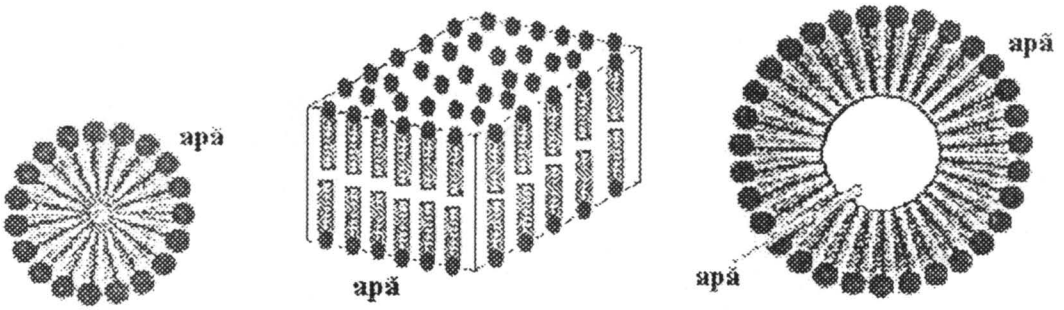


Fig. III.2 Aranjamente ale unor molecule amfifilice în mediu apos

Prin acest aranjament, catenele hidrofobe (între care se stabilesc legături nepolare) sunt protejate de contactul direct cu apa.

Pentru amfifilii cu catenă relativ mică, cmc este ~1mM, în timp ce pentru lipidele biologice, majoritatea având două catene hidrofobe lungi, cmc $<10^{-6}$ M.

Conformația straturilor lipidice duble este de fapt structura lipidică de bază a tuturor membranelor celulare biologice. Ele sunt structuri foarte stabile, datorită interacțiilor dintre lanțurile hidrocarbonate hidrofobe, astfel încât suprafața pe care acestea vin in contact cu apa să fie redusă la minim. Pe de altă parte, forțele de interacție dintre moleculele de apă şi grupele polare ale lipidelor conferă structurilor o mare rezistență la rupere.

Dimensiunile şi forma aproximativă a unui miceliu pot fi prevăzute din considerente geometrice. Astfel, amfifilii cu catene hidrofobe simple, ca anionii săpunurilor, formează micelii sferoide, pentru că raportul dintre grupele lor hidrofile hidratate şi restul hidrofob are valori mai mari. De aceea, împachetarea moleculelor sub formă de micelii sferice va fi mai eficientă (fig. III.2a). Dacă concentrația amfifilului în apă este inferioară valorii cmc, atunci formațiunile globulare vor avea un miez apos (fig. III.2c).

Glicerofosfolipidele şi sfingolipidele, având în molecule câte două catene hidrofobe, vor prezenta o împachetare sterică sub formă de micelii cilindrice (fig. III.3).

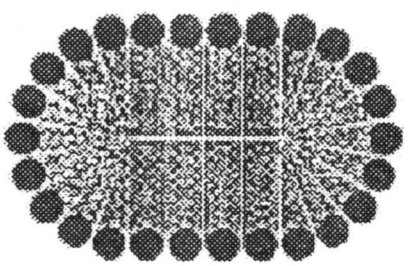


Fig. III.3 Micelii cilindrice caracteristice moleculelor amfifilice, cu două catene hidrofobe

Existența unor straturi duble fosfolipidice a fost demonstrată de către E. Goster şi F. Grendell, în 1925; ei au observat că fosfolipidele extrase din eritrocite, daca sunt pulverizate în monostrat pe interfața apă-aer, ocupă o suprafață dubla față de cea ocupată în membrana plasmatică eritrocitară.

Structurile fosfolipidice duble (bistraturile) au o grosime de ~ 60 nm. S-a dedus că asemenea straturi formează baza structurală a membranelor biologice, în care straturile fosfolipidice duble sunt asociate cu proteine.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Lipozomii

O suspensie de fosfolipide în apă formează prin agitare vezicule multilamelare, in care straturile lipidice duble, concentrice, închise în ele însele, alternează cu straturi apoase. Aceştia sunt lipozomii multilamelari, care prin rupere cu ultrasunete, se transformă în lipozomi monolamelari, sferici, în care un strat apos este închis într-un strat fosfolipidic dublu (fig. III.4).

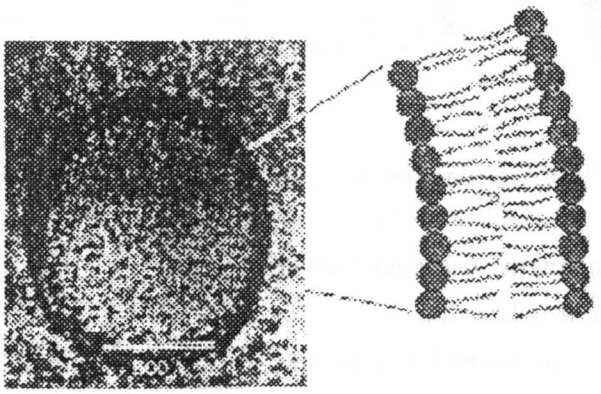


Fig. III.4 Micrografia electronică a unui lipozom monolamelar

Lipozomii cu diametrul de ~ 1000 nm au fost obținuți fie prin injectarea unei soluții etanolice de fosfolipidă în apă în prezența unui agent tensioactiv (detergent), fie prin dispersarea fosfolipidei într-o soluție apoasă de detergent, urmată de dializarea detergentului.

Altă metodă constă în dizolvarea fosfolipidei într-un solvent organic, care se îndepărtează apoi la presiune redusă, într-un evaporator rotativ. Filmul subțire de lipidă astfel depus pe pereții balonului se dispersează în apă, în prezența unui agent tensioactiv.

În fine, se mai pot obține lipozomi prin stratificarea soluției de fosfolipidă într-un solvent organic pe suprafața apei, după care solventul se îndepărtează cu un curent de gaz inert.

Stratul lipidic bimolecular al lipozomilor nu numai că are el însuşi o mare stabilitate, dar prezintă şi o fluiditate datorită căreia molecule individuale, incluse în stratul apos interior, pot fi transportate prin organism.

Dacă în loc de apă se utilizează soluții apoase de substrate fiziologic active, acestea pot fi incluse (microencapsulate) în lipozomi.

Indiferent de metoda de obținere, într-o primă etapă se formează lipozomi multilamelari, care se rup cu ultrasunete. Lipozomii monolamelari sunt structuri foarte stabile, putând fi separați prin dializă, gel-filtrare sau centrifugare.

Lipozomii pot fi obținuți utilizând fie fosfolipide naturale extrase din surse biologice (lecitina din gălbenuşul de ou), fie fosfolipide sintetice.

Studiul lipozomilor oferă modele asemănătoare cu membranele biologice.

O aplicație deosebită a lipozomilor este transformarea lor în "vehicule" pentru introducerea în organism a unor substanțe fiziologic active (enzime, hormoni, vitamine, antibiotice etc.) utilizate în terapia de substituție (deficiențe genetice) sau în tratarea unor dereglări metabolice.

Variind dimensiunile (diametrul) lipozomilor, aceştia pot fi utilizați pentru injectarea "in vivo" a unor asemenea substanțe incluse în interiorul lor, în diverse țesuturi (sânge, muşchi, cavitate peritoneală etc.), sau pentru fabricarea unor pansamente de uz extern. În acest fel,

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

lipozomii transportă selectiv compuşi bioactivi la centrele specifice intracelulare, în special în sistemul reticulo-endotelial.

Lipozomii mai prezintă şi avantajul biocompatibilităţii; în plus, stratul fosfolipidic dublu are o permeabilitate selectivă, neputând fi traversat de molecule cu dimensiuni mari (ca proteinele), care ar putea declanşa reacţii imunologice în organism.

Pentru terapia umană se preferă fosfolipidele sintetice (lecitine, fosfatidil-serine), deoarece cele naturale se contaminează uşor cu germeni imunogeni.

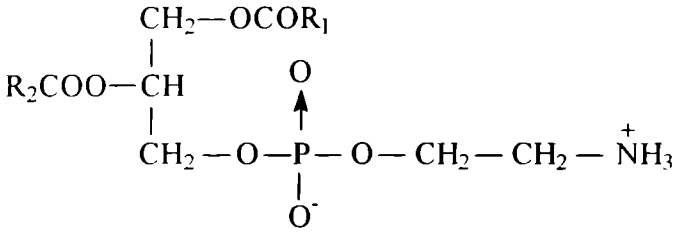
Uneori, pentru a mări stabilitatea straturilor fosfolipidice ale lipozomilor, este necesară complexarea lor cu colesterol sau ergosterol.

În general, utilizarea lipozomilor în terapia medicală este legată de două direcţii principale:

- terapia de substituire a unor enzime (pierdute de organism sau inexistente) şi
- aplicaţii medicale diverse (terapia medicamentoasă a unor maladii, fabricare de seruri şi vaccinuri, tratamente cu antibiotice, vitamine, hormoni etc.).

B.2. Cefaline (fosfatidil-etanolamine, etanolamin-fosfogliceride)

Cefalinele sunt esteri ai acizilor fosfatidici cu etanolamina (colamina):



Ca şi în cazul lecitinelor, R_1 este saturat, iar R_2 – nesaturat.

În comparaţie cu lecitinele, cefalinele sunt mai puţin bazice. La pH fiziologic se găsesc sub formă amfiionică.

Deşi asemănătoare structural cu lecitinele, cefalinele se deosebesc de acestea prin unele proprietăţi, ca de exemplu solubilitatea: cefalinele sunt greu solubile sau insolubile la rece în metanol, etanol şi piridină, în care lecitinele se dizolvă.

În organismele animale, cefalinele însoţesc lecitinele, dar în cantităţi mai mici în comparaţie cu acestea. Creierul este organul cel mai bogat în cefaline, care sunt prezente în cantităţi mai mici în muşchi şi în rinichi.

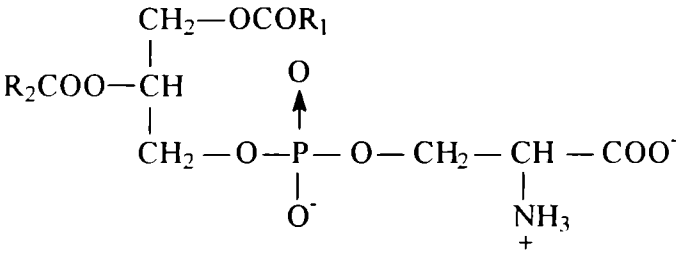
Ca parte a membranelor celulare, cefalinele joacă un rol important în permebilitatea acestora. Ca şi în cazul lecitinelor, cefalinele pot fi scindate de unele enzime specifice, fiind transformate în lizocefaline, cu acţiune hemolitică.

În calitate de componente majoritare ale celor mai multor membrane din celulele animale, fosfatidilcolinele şi fosfatidiletanolaminele sunt înrudite metabolic. Fosfatidiletanolaminele sunt precursori în biosinteza fosfatidilserinelor.

B.3. Serincefaline (fosfatidilserine)

In serincefaline, grupa hidroxi a L-serinei este esterificată cu un rest de acid α-L-fosfatidic:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



R_1 = saturat (mai ales rest de acid stearic);

R_2 = nesaturat (mai ales rest de acid oleic).

Datorită grupelor polare prezente în moleculă, vor predomina proprietățile acide ale serincefalinelor.

Față de lecitine și cefaline, serincefalinele sunt distribuite în natura vie într-o proporție redusă. Ele se găsesc în țesuturile animale și vegetale. Țesutul cerebral contine serincefaline în cantități apreciabile (până la 5% din totalul fosfogliceridelor), în timp ce în alte țesuturi, în care însoțesc de obicei alte glicerofosfolipide, conținutul lor procentual este redus. De asemenea, serincefalinele însoțesc în cantitate mică celelalte fosfatide din unele plante (de exemplu, în arahide se găsesc în cantități de 1,5-3%, iar în soia 1-2%).

Serincefalinele contribuie la mărirea permeabilității membranelor celulare și pot servi ca sursă metabolică de resturi fosfat.

Biosinteza majorității glicerofosfolipidelor decurge în paralel cu cea a trigliceridelor, până la etapa de acid fosfatidic sau de diglicerid. Din acest stadiu, digliceridul se esterifică cu un nou acid gras, conducând la trigliceride, sau (în paralel) poate incorpora fosforilcolina, fosforiletanolamina sau fosforilinozitolul, conducând la fosfogliceride.

C. Proprietăți generale ale glicerofosfolipidelor

Glicerofosfolipidele sunt substanțe solide, de culoare albă, cu aspect ceros. Prin expunere la aer, se închid la culoare, datorită tendinței radicalilor acil nesaturați din moleculă de a forma hidroperoxizi, care pot suferi, la rândul lor, diferite transformări (scindări, izomerizări etc.).

Glicerofosfolipidele, fiind substante amfifilice, au solubilitate mică în apă, în care pot forma micelii. Sunt de asemenea greu solubile în acetonă anhidră (la rece), dar se dizolvă ușor în majoritatea solvenților organici nepolari.

La pH neutru, fosfatidiletanolamina, ca și fosfatidilserina, are o sarcină negativă netă. În aceleași condiții de pH, acizii fosfatidici, fosfatidilinozitolii și fosfatidilglucidele conțin o sarcină negativă la grupa fosfat.

Deosebirile care apar în forma, dimensiunile și sarcinile electrice din moleculele glicerofosfolipidelor joacă un rol important în structurarea și permeabilizarea membranelor biologice.

Deoarece conțin în moleculă legături esterice (carboxilat, fosfat), glicerofosfolipidele pot fi hidrolizate chimic sau enzimatic.

Datorită structurii lor amfifilice, glicerofosfolipidele formează micelii cilindrice în mediu apos, asigurând solubilizarea și transportul lipidelor hidrofobe prin acest mediu.

Datorita structurii lor amfotere, majoritatea glicerofosfolipidelor formează asocieri supramoleculare cu proteinele, sub formă de lipoproteine. Aceste asocieri participă la

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

structurarea membranelor biologice, asigurându-le acestora permeabilitatea selectivă şi transportul diverselor specii moleculare prin membrane.

În cursul proceselor metabolice, glicerofosfolipidele suferă reacţii de degradare, eliberând resturi fosfat, indispensabile activităţii celulare, acizi graşi saturaţi şi nesaturaţi şi alţi metaboliţi.

III.3.2.2. Sfingolipide

Sfingolipidele sunt lipide complexe, derivate de la sfingozină sau compuşi înrudiţi cu sfingozina. Moleculele sfingolipidelor includ trei părţi importante:

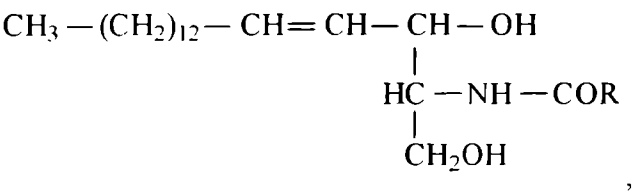
- un rest de sfingozină sau un derivat al acesteia cu C_{16} – C_{20}, predominând C_{18}, care la mamifere derivă de la sfingozină sau de la dihidrosfingozină (sfinganină);
- în plantele superioare şi în drojdii - rest de fitosfingozină (4-hidroxisfinganină);
- în nevertebratele marine – resturi de sfingadiene (de exemplu, 4,8-sfinganină);
- un radical acil provenit de la un acid gras saturat sau nesaturat (C_{18} – C_{26}), care se leagă amidic la grupa $-NH_2$ din sfingozină;
- o grupă polară, cu sau fără fosfor, sub formă de rest fosfat.

Sfingolipidele sunt prezente în membranele celulelor animale şi vegetale. În organismele animale, se găsesc în cantităţi mari în ţesutul nervos şi în terminaţiile nervoase. Numai în cantitate foarte mică sunt prezente în lipidele de rezervă.

A. Sfingolipide fără fosfor

A.1. Ceramide

Ceramidele sunt derivaţi N-acilaţi ai sfingozinei:



, în care R reprezintă radicali hidrocarbonaţi proveniţi de la acizi graşi superiori (C_{16}, C_{18}, C_{22}, C_{24}).

Ceramidele sunt răspândite în plante şi animale (ţesut nervos, ficat, splină etc.). Aceste substanţe se găsesc în cantităţi mici în celule, ca stadii intermediare în biosinteza celorlalte sfingolipide.

A.2. Glicosfingolipide

Acestea sunt derivaţi ai ceramidelor, care au în structura lor o grupă polară reprezentată de un rest de natură glucidică, neutru sau conţinând grupe acide, care se leagă β-glicozidic la atomul de carbon C_1 din ceramidă. După natura părtii polare a moleculelor, glicosfingolipidele se subclasifică în: cerebrozide, sulfatide şi gangliozide.

Glicosfingolipide neutre (cerebrozide)

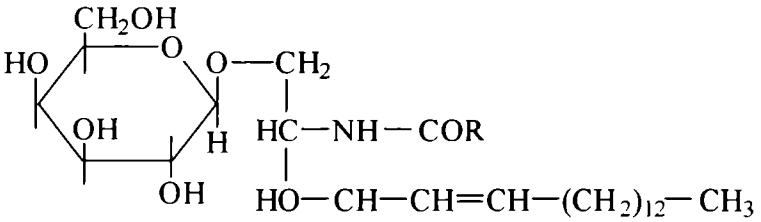
Cerebrozidele au drept grupă polară un rest monoglucidic; ele sunt deci ceramidmonoglucide. Monoglucida întâlnită cel mai frecvent este D-galactoza, în timp ce D-glucoza se găseşte în cantităţi mai mici.

Radicalii acil predominaţi în moleculele cerebrozidelor naturale conţin 24 atomi de carbon şi rezultă de la acizii graşi saturaţi, nesaturaţi sau de la hidroxiacizi.

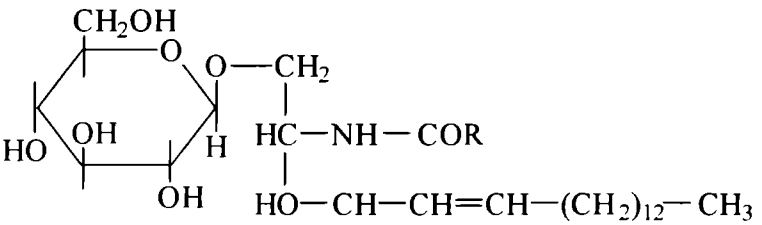
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cerebrozidele sunt substanțe solide, asemănătoare cerurilor, solubile în anumiți solvenți organici (acid acetic, cloroform, piridină), insolubile în alții (etanol, eter de petrol, eter etilic) și care prezintă activitate optică.

Din punctul de vedere al resturilor monoglucidice, cerebrozidele pot fi: β-D-galacto-cerebrozide și β-D-glucocerebrozide:



β-D-Galactocerebrozidă



β-D-Glucocerebrozidă

Se poate considera că restul de ceramidă este agliconul acestor glicozide.

La hidroliza chimică sau enzimatică totală, cerebrozidele se scindează în cele trei părți componente (sfingozină, acidul gras și glucida), iar la hidroliză parțială se îndepărtează doar una din aceste componente structurale, cu obținerea ceramidelor sau a psihozinelor (cerebrozide dezacilate), ambele tipuri de substanțe fiind și intermediari în biosinteza sfingolipidelor.

Galactocerebrozidele se găsesc în țesutul nervos (membranele celulelor nervoase din creier), în timp ce glucocerebrozidele sunt localizate în membranele altor țesuturi.

Spre deosebire de fosfolipide, cerebrozidele sunt compuși neionici.

Glicofosfolipidele neutre mai pot conține ca parte polară o oligoglucidă (di-, tri-, tetraglucidă); ele au fost denumite (în funcție de restul de oligoglucid) di-, tri- și tetrahexozide sau globozide.

Partea oligoglucidică a globozidelor poate conține ca unități monoglucidice: D-glucoza, D-galactoza sau derivați ai lor, ca: N-acetil-D-glucozamina și N-acetil-D-galactozamina.

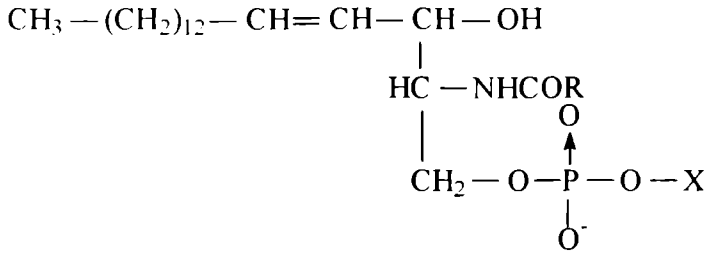
Ele se întâlnesc în ser, splină, ficat și eritrocite.

Glicosfingolipidele neutre, constituente ale suprafeței celulare din organismele animale, sunt orientate cu partea nepolară în stratul fosfolipidic dublu al membranelor celulare și cu partea polară la suprafața lor. Glicosfingolipidele prezente pe suprafața celulelor roșii din sânge determină specificitatea de grup sanguin.

B. Sfingolipide cu fosfor

Sfingomielinele sunt lipide complexe, derivate de la ceramide, în care grupa –OH din poziția 1 a sfingozinei este esterificată cu acid fosforic, cu fosforilcolina sau cu fosforiletanolamina:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Sfingomielină

$$X = -CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3 \text{ ;}$$
$$-CH_2-CH_2\overset{+}{N}H_3$$

Radicalii R cei mai răspândiți în structura sfingomielinelor provin din acidul lignoceric sau de la acidul nervonic.

Sfingomielinele, ca şi lecitinele şi cefalinele, sunt substanțe amfotere, care la pH=7 au structură amfiionică. De aceea, proprietățile sfingomielinelor sunt asemănătoare cu cele ale lecitinelor şi cefalinelor.

Sfingomielinele sunt cele mai importante şi cele mai abundente sfingolipide din țesuturile animalelor superioare, fiind distribuite majoritar în sistemul nervos, dar prezente şi în alte țesuturi (în lipidele din serul sanguin). În creier, alături de sfingomieline au fost identificate şi sfingozine polinesaturate.

În țesutul nervos, sfingomielinele joacă un rol de protecție pentru tecile de mielină, care formează manşoane discontinue în jurul fibrelor nervoase. Proprietățile de izolant electric ale mielinei induc o propagare a impulsului nervos "în salturi" succesive, între regiunile axonului lipite de mielină (nodurile Ranvier). La diametru egal, fibrele nervoase mielinizate conduc influxul nervos mult mai rapid decât fibrele amielinice.

În nevertebrate şi protozoare au fost puşi în evidență compuşi înrudiți cu sfingomielinele, în care restul azotat al părții polare [$-CH_2CH_2\overset{+}{N}H_3$ sau $-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$] se leagă direct de atomul de fosfor şi nu prin intermediul atomului de oxigen, ca la sfingomieline.

Sfingomielinele din serul uman (conținute în proporție de 200 mg/l alături de alte sfingolipide) se pot doza colorimetric, prin complexare cu metiloranj.

III.4. Lipide nesaponificabile

Din această categorie fac parte substanțe conținute în cantități mici în celule, care prin hidroliză chimică sau enzimatică nu conduc la acizi graşi.

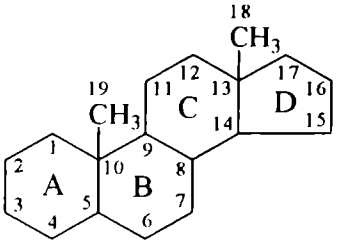
S-a convenit să fie incluse în această clasă steroidele şi unele terpenoide.

Solubilitatea lor redusă ca şi participarea la constituirea straturilor bilipidice din sistemele biologice, le-a recomandat pentru includerea în categoria lipidelor, deşi, structural, nu se încadrează în definiția generală a acestora.

III.4.1. Steroide

Steroidele sunt derivați ai ciclopentanoperhidrofenantrenului (scheletul de bază):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Din această categorie fac parte o serie de steroide cu activitate biologică intensă (acizii biliari, hormonii sexuali, hormonii adrenocorticoizi ca şi otrăvurile cardiace şi veninul de broască râioasă).

Dacă majoritatea acestora sunt prezente doar în urme în celule, sterolii sunt foarte abundenți.

Steroli

Sterolii conțin o grupă –OH alcoolică la C_3 şi un lanț hidrocarbonat ramificat, cu 8 sau mai multi atomi la C_{17}. Ei apar fie ca alcooli liberi, fie ca esteri cu acizii graşi la grupa –OH de la C_3.

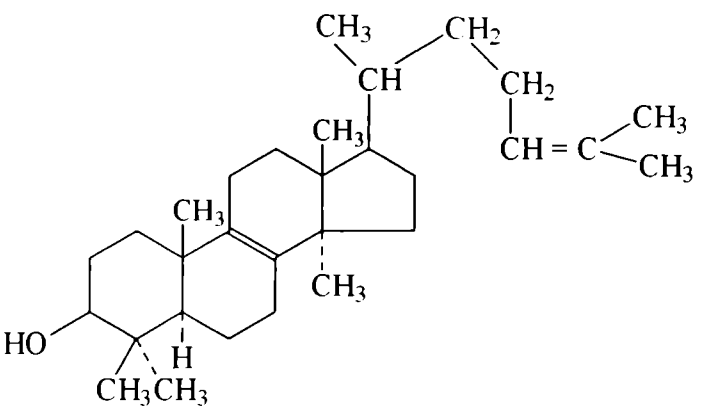
Colesterolul este cel mai abundent sterol din țesuturile animale, unde este prezent în ambele forme: esterificat cu acizi graşi superiori (III.3.1.5) sau în stare liberă, fiind component al membranelor celulare. Colesterolul, în amestec cu fosfogliceridele, formează spontan straturi lipidice duble între două două compartimente apoase. Acest lucru explică rolul său foarte important în structurarea membranelor biologice, cu proprietăți specifice (rezistență electrică şi capacitanță înalte, înaltă permeabilitate față de apă şi de electroliți etc.); aceste straturi lipidice duble sunt asociate cu proteine.

Colesterolul este o substanță solidă, albă, cristalină, optic activă, cu punct de topire 150°C, insolubilă în apă; se extrage uşor din celule cu: cloroform, eter etilic, benzen sau alcool la cald.

În sursele naturale, colesterolul amestecat cu gliceride şi fosfolipide determină reținerea de molecule de apă prin absorbție. Această proprietate se datorează caracterului său amfifilic, determinat de prezența grupei –OH hidrofile, alături de scheletul policiclic hidrofob. Acest schelet îi conferă o rigiditate mai mare, în comparație cu alte lipide din membranele biologice.

Colesterolul este prezent în cantități mari în lipoproteinele din plasma sanguină, în care aproximativ 70% este esterificat cu acizi graşi, sub formă de steride.

Lanosterolul, care a fost separat din grăsimile de pe firele de lână ale animalelor, este şi un intermediar important în biosinteza colesterolului.

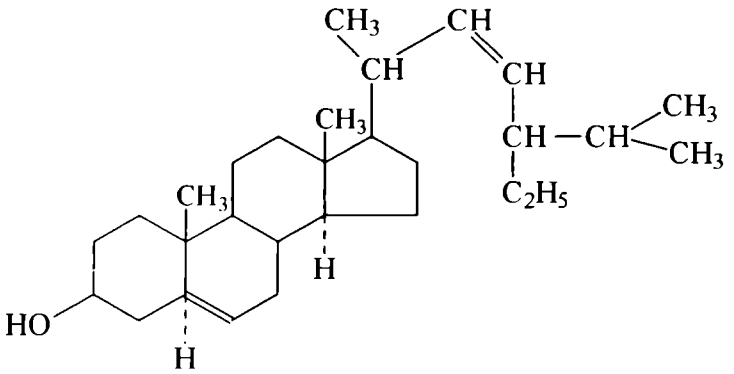


Lanosterol

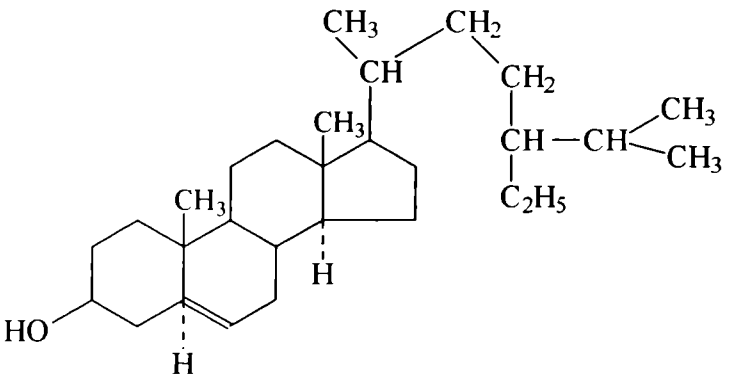
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Colesterolul şi lanesterolul sunt zoosteroli, izolaţi din organismele animale (tabel nr. III.4).

Colesterolul nu este prezent în plante, care conţin alte tipuri de steroli – fitosteroli (tabel nr. III.4). Printre aceştia se găsesc stigmasterolul (C_{29}) şi β-sitosterolul.



Stigmasterol

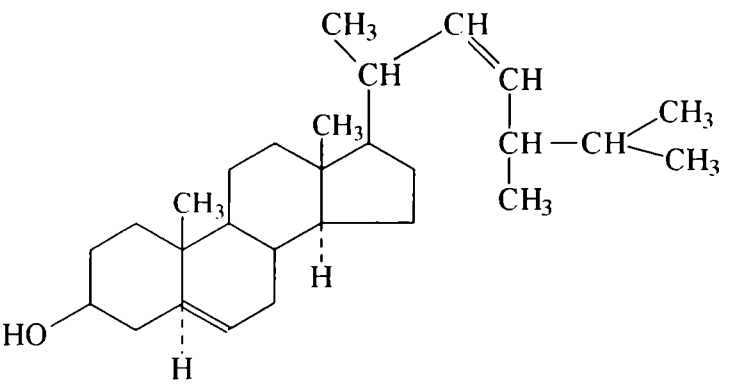


β-Sitosterol

Din porţiunea nesaponificabilă a grăsimilor vegetale, au mai fost izolaţi:

- brasicasterolul (C_{28}) din uleiul de rapiţă;
- campesterolul (C_{28}) din *Brasica campestris*;
- spinasterolul din spanac.

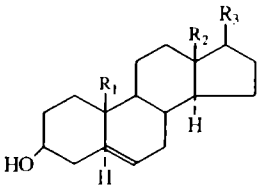
În fungi şi drojdii se găsesc micosterolii (tabel nr. III.4), dintre care cel mai important este ergosterolul ($C_{28}H_{44}O$), cel mai uşor accesibil. Ergosterolul izolat în cantităţi mari din drojdia de bere serveşte la obţinerea vitaminei D_2.

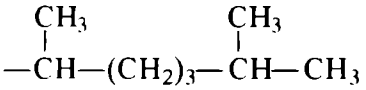
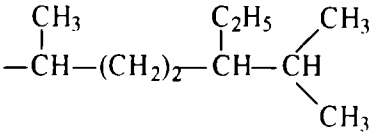
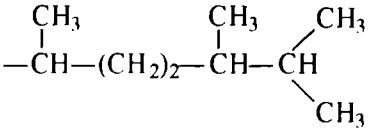


Ergosterol

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. III.4

Steroli de forma  izolați din surse naturale

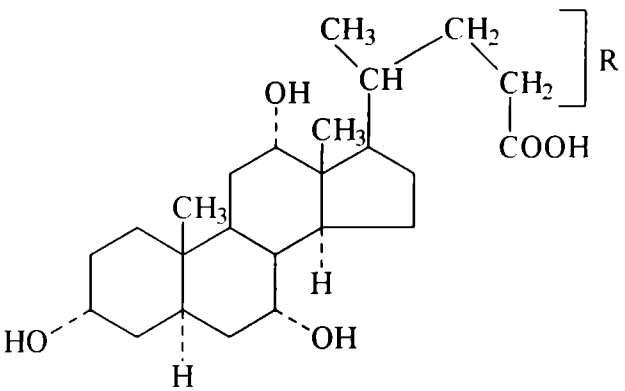
Număr de atomi C	Tipul	R_1	R_3	Exemple
27	I Zoosteroli	CH_3		Colesterol
28	II Fitosteroli, steroli marini	CH_3		Stigmasteroli
28	III Micosteroli, fitosteroli, steroli marini	CH_3		Ergosterol, brasicasterol, campesterol

Sterolii nu sunt prezenți în bacterii.

III.4.2. Acizi biliari

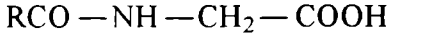
Acizii biliari, componenți ai bilei din ficat, joacă un rol important în digestia grăsimilor, producând solubilizarea şi absorbția lor intestinală. Acizii biliari se biosintetizează din colesterol, eliminarea lor prin fecale reprezentând o cale de excreție a acestuia.

Cel mai important este acidul colic.

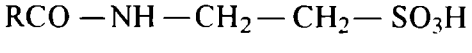


Acidul colic

Amida acidului colic cu glicocolul se numeşte acid glicocolic, iar cea derivată de la taurină poartă denumirea de acid taurocolic.



Acid glicocolic



Acid taurocolic

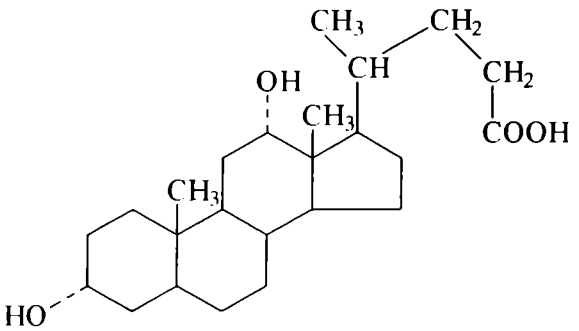
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Aceşti acizi se găsesc în fiere, sub forma sărurilor lor de sodiu.

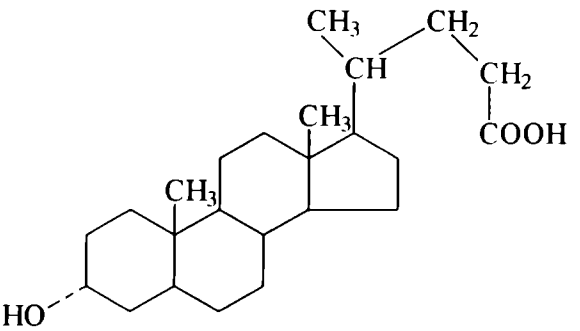
Principalii acizi biliari izolaţi din fierea de om şi de bou sunt:

- acidul colic ($C_{23}H_{39}O_3$ – COOH);
- acidul desoxicolic ($C_{23}H_{39}O_2$ – COOH);
- acidul litocolic ($C_{23}H_{39}O$ – COOH).

Din fierea de porc s-au mai izolat cei doi izomeri ai acidului desoxicolic, ca şi acidul bio-desoxicolic; din fierea de gâscă (şi de om) s-a mai izolat şi acidul chemodesoxicolic.



Acidul desoxicolic



Acidul litocolic

Rolul fiziologic al acizilor biliari este legat de digestia lipidelor.

Acizii biliari amidificaţi (acidul glicocolic şi acidul taurocolic), sub forma sărurilor de sodiu, solubilizează numeroase substanţe hidrofobe, făcând posibilă trecerea lor prin mucoasa intestinală. Printre aceste substanţe se numără: acizii graşi proveniţi din hidroliza grăsimilor, gliceridele nehidrolizate, β-carotina din hrană şi vitamina K produsă de bacteriile intestinale. Astfel, persoanele bolnave de icter obstructiv, la care nu are loc scurgerea normală a fierii în intestin, suferă hemoragii din cauza carenţei în vitamina K din sânge.

De asemenea, acizii biliari solubilizează şi numeroase medicamente insolubile în apă, cum ar fi chinina, facilitând resorbţia lor.

În calitatea lor de substante amfifilice, acizii biliari facilitează formarea miceliilor de lipide în mediul apos. Ei formează cu lecitinele agregate de forma unor bastonaşe.

Miceliile formate din lecitină sunt învelite cu un strat de săruri biliare, care expun spre exterior grupele lor hidrofile ($-COO^-$ şi SO_3^-). Aceste micelii mixte lecitine – săruri biliare pot solubiliza lipidele hidrofobe mai polare (acizi graşi, monogliceride) sau mai puţin polare (colesterol, acil-colesterol, trigliceride), prin incorporarea resturilor nepolare ale moleculelor în centrul hidrofob al miceliilor.

În egală măsură, acizii biliari sunt astfel implicaţi nu numai în digestia grăsimilor, dar şi în absorbţia produşilor acestei digestii. Aproximativ 95% din acizii biliari implicaţi în digestia grăsimilor sunt absorbiţi la nivelul muşchiului ileal şi revin în ficat prin circulaţia venoasă. Restul de 5% din acizii biliari regeneraţi după digestia grăsimilor suferă acţiunea bacteriilor intestinale, produşii de degradare (derivaţi cetonici) fiind excretaţi.

Acizii biliari sunt conţinuţi în urină, serum, fecale, bilă şi în lichidul duodenal. Determinarea nivelului lor în aceste surse permite explorarea eventualelor dereglări metabolice apărute în funcţionarea ficatului şi bilei, ca şi în absorbţia intestinală.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

III.5. Aspecte legate de rolul biologic al lipidelor

III.5.1. Lipoproteinele plasmatice

În plasmă, lipidele sunt asociate cu proteinele, sub formă de lipoproteine (tabel nr III.1). Asocierea celor două specii de biomolecule este spontană (autoasamblare) şi se face în majoritatea cazurilor prin legături necovalente (mai ales interacţii hidrofobe).

Lipoproteinele din serul sanguin se deosebesc între ele prin: densitate, compoziţie, mobilitate electroforetică. Ele au fost izolate prin electroforeză sau prin sedimentare fracţionată.

După cum se poate observa din tabelul nr. III.1, în functie de densitate, lipoproteinele pot fi clasificate în: chilomicroni, lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL), cu densitate mică (LDL) şi cu densitate înaltă (HDL). De asemenea, s-au pus în evidenţă şi lipoproteinele cu densitate intermediară (IDL) absente în plasma circulantă pe nemâncate.

Alături de aceste tipuri de proteine conjugate, în serul sanguin mai există şi cantităţi mici de acizi graşi nesaturaţi liberi (AGL), care participă efectiv la formarea complexelor lipoproteice din membranele celulare.

Dacă chilomicronii se produc în celulele epiteliale intestinale, iar VLDL şi HDL în hepatocite, LDL se formează în plasma circulantă, prin degradarea enzimatică a chilomicronilor şi a VLDL.

Particulele IDL apar în plasma circulantă numai ca rezultat al scindării enzimatice a trigliceridelor din chilomicroni şi VLDL. Ele lipsesc din plasma recoltată pe nemâncate, dar cantitatea lor creşte după ingerarea de alimente. În absenţa alimentării, IDL pot fi prezente numai în plasma unor bolnavi de dislipidemie ereditară.

Lipoproteinele LDL, care conţin din abundenţă trigliceride şi colesterol liber, prezente în plasma circulantă, sunt capabile de a se fixa specific de receptorii celulari, datorită apoproteinelor pe care le conţin având aderenţă la proteinele din membrană.

Colesterolul liber din LDL, care poate fi introdus în celulă, reprezintă un risc aterogen, fiind denumit şi "colesterol rău". El poate pătrunde în celulă datorită compatibilităţii dintre proteinele LDL şi proteinele membranare.

Chilomicronii sunt formele emulsionate în plasmă ale grăsimilor neutre de origine alimentară, lipsind din plasma recoltată pe nemâncate.

VLDL conţin multe trigliceride şi colesterol liber. Conţinutul normal al plasmei în VLDL este de 5% din totalul de lipoproteine. Valori crescute ale VLDL semnalează riscul de aterogeneză.

HDL conţin 50 – 60% proteine; în aceste lipoproteine predomină fosfolipidele, din care cauză, la lansarea lor în circulaţie, au formă de micelii cilindrice. Rolul HDL este de a fixa colesterolul esterificat, care este transportat înapoi la ficat. Colesterolul esterificat vehiculat de HDL nu reprezintă un risc aterogen, din care cauză a fost denumit "colesterol bun". Din totalul lipoproteinelor plasmatice, cantităţile de HDL fiziologice sunt de 25% la bărbaţi şi de 30% la femei.

Lipoproteina-X (Lp-X) este o formă patologică, care se formează în hepatocite, în cursul unor stări de colestază. Lp-X se aseamănă structural cu LDL, fiindcă conţine multe trigliceride şi colesterol liber, dar, spre deosebire de celelalte lipoproteine, migrează spre catod. Prezenţa Lp-X în ser poate fi rezultatul lipsei congenitale a enzimei lecitin-colesterol-aciltransferaza.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Conținutul normal al plasmei umane în lipide este de 5 – 7 g/l (500 – 700 mg %). Dozarea lipidelor serice totale ca şi a componentelor acestora (colesterol, trigliceride, fosfolipide) pot da seama de starea de sănătate a organismului.

Lipidele totale din ser pot fi determinate după scindarea lipoproteinelor care le conțin, fie printr-o denaturare proteică în mediu slab acid, fie insolubilizând proteinele cu solventi organici (metanol, propanol, eter, cloroform, acetonă). Se obține un extract lipidic, din care lipidele totale se determină cantitativ (gravimetric, colorimetric, turbidimetric).

Etapa următoare o reprezintă separarea şi dozarea componentelor din extractul lipidic total. Acest lucru se realizează de obicei cromatografic (cromatografia pe coloană sau în strat subțire).

În tabelul nr. III.5 sunt indicate valorile fiziologice ale lipidelor serice pentru adulți.

Tabelul nr. III.5

Valori fiziologice ale lipidelor serice

Compuşi	Compoziție (g/l)
Lipide totale	5,5 – 7,5
1. Steride	
Colesterol total	1,8 – 2,6
Colesterol liber	0,5 – 0,8
Colesterol esterificat	2,0 – 3,5 (ținând cont de acizii graşi esterificanți)
2. Gliceride	
Trigliceride	0,7 – 1,3
3. Acizi graşi neesterificați	0,14 – 0,2 (0,5 – 0,7 mmol/l)
4. Lipide complexe	
Fosfor lipidic	60 – 100
Fosfolipide	1,5 – 2,5
Lecitine	1,2 – 2,09
Cefaline	0,05 – 0,2
Lizolecitine	0,1 – 0,2
Sfingomieline	0,1 – 0,3
5. Carotenoide	2 - 20

În ceea ce priveşte termenii individuali, s-a observat că, in general, se preferă dozarea trigliceridelor şi colesterolului.

A) Determinarea fosfolipidelor serice prezintă un interes mai redus de când a crescut cel pentru trigliceride şi colesterol. Totuşi, dozarea fosfolipidelor totale sau a constituenților lor majori, are valoare în special în diagnosticarea icterului obstructiv. S-a observat că, în general, concentrația fosfolipidelor serice totale variază în acelaşi sens cu concentrația colesterolului total.

Deşi variația lor fiziopatologică este încă incomplet elucidată, comparându-le cu valorile trigliceridelor şi colesterolului, fosfolipidele pot furniza date interesante legate de rolul lor în structura lipoproteinelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

B) Trigliceridele serice se pot doza printr-o mare varietate de metode (colorimetrice, fluorimetrice, enzimatice).

În ceea ce priveşte intervalul de referinţă pentru valorile fiziologice, acestea depind de vârstă, sex, dar şi de obiceiurile alimentare, ca şi de aria geografică.

În general, valorile trigliceridelor plasmatice sunt de 0,95 ± 0,35 g/l (exprimate în trioleină ca etalon) sau de 1,05 ± 0,4 mmol/l.

Trigliceridele cresc cu vârsta şi sunt mai ridicate la bărbaţi decât la femei.

C) În patologia umană, dozarea colesterolului seric are importanţă în diagnosticarea hiperlipoproteinemiilor.

După cum am mai arătat, fracţiunile lipoproteice din ser care conţin colesterol sunt: LDL (cu "colesterol rău", în stare liberă) şi HDL (cu "colesterol bun" esterificat).

Colesterolul seric se determină din extractul lipidic total în două etape principale: saponificarea (pentru eliberarea colesterolului liber din esterii săi) şi dozarea propriu-zisă a colesterolului total, în care se utilizează în special spectrofotometria (IR, colorimetrie), dar şi gaz-cromatografia.

Pentru stabilirea raportului cantitativ dintre colesterol esterificat/colesterol total, influenţat de activitatea colesterol-esterazei hepatice, se utilizează de asemenea o serie de metode colorimetrice şi cromatografice, care dozează direct colesterolul liber din extractul seric; colesterolul esterificat se determină prin diferenţă:

Colesterol esterificat = Colesterol total – Colesterol liber

O serie de afecţiuni sunt semnalate direct de variaţia colesterolului seric.

Astfel, în hepatită, la început are loc o creştere a nivelului colesterolului, care scade pe măsură ce boala avansează. Nivele crescute de colesterol, trigliceride şi fosfolipide semnlează un sindrom nefrotic. Diabetul se asociază cu hipercolesterolemia şi cu hipertrigliceridemia.

Între nivelele crescute de colesterol şi boli ale aparatului cardiovascular, ca ateroscleroza şi afecţiunile inimii există o strânsă legatură. Astfel, în patogeneza aterosclerozei, este necesară determinarea (în corelaţie) a colesterolului total şi a trigliceridelor serice din HDL. Se consideră că valorile optime ale colesterolului nu trebuie să depăşească 200 mg/dl (5,2 mmol/l), iar trigliceridele trebuie să fie conţinute sub 140 mg/dl (1,6 mmol/l).

Pe de altă parte, nivelul "colesterolului rău" din LDL se calculează după formula:

$Colesterol_{LDL}$ = Colesterol total – [$Colesterol_{VLDL}$ + $Colesterol_{HDL}$]

Colesterolul din VLDL (mg/dl) se obtine împărţind la 5 valoarea trigliceridelor serice (mg/ml).

Valorile optime ale "colesterolului rău" din LDL oscilează în domeniul 70 – 130 mg/dl..

Lipidele totale se calculează după relaţia:

Lipide totale (mg/dl) = Colesterol total x 2,25 + 90 + trigliceride

În tabelul nr. III.6 sunt prezentate nivelurile lipoproteinelor serice (LDL şi HDL) în aprecierea riscului de infarct coronarian, corelate cu valorile colesterolului şi trigliceridelor.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. III.6

Riscuri de coronaropatie în funcție de nivelul lipidelor serice umane (mg/dl)

1) Colesterol < 200, Trigliceride < 200 } risc scăzut

2) Colestrol > 300 risc crescut

3) Colesterol 200 - 300, Trigliceride > 200 } risc în funcție de HDL-colesterol și LDL-colesterol

Sex	Risc redus	Risc mediu	Risc crescut
Bărbați	HDL ≥ 55 LDL ≤ 130	HDL = 33 – 35 LDL = 130 – 160	HDL ≤ 35 LDL ≥ 160
Femei	HDL ≥ 65 LDL ≤ 130	HDL = 45 – 65 LDL = 130 – 160	HDL ≤ 45 LDL ≥ 160

III.5.2. Digestia lipidelor

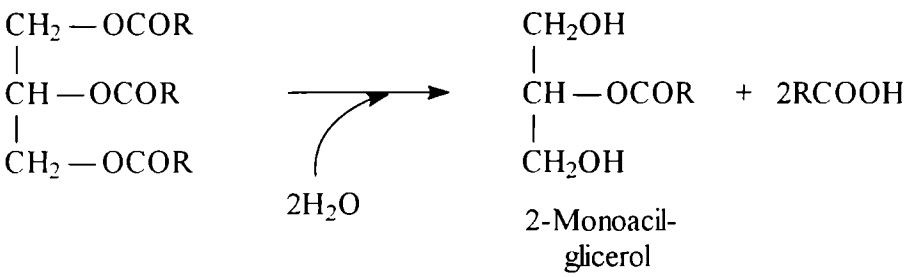
Principalele componente lipidice din hrana oamenilor (90%) o reprezintă trigliceridele, iar în cantitate mai mică fosfolipidele (lecitine, cefaline, sfingomieline), colesterol liber şi acil-colesteroli. Vitaminele liposolubile (A, D, E, K) şi carotenul sunt dizolvate în grăsimile din raţia alimentară.

Digestia lipidelor are loc în intestin, cu ajutorul enzimelor digestive (lipaze pancretice specifice) solubile în apă, la interfaţa lipidă – apă şi sub influenţa acizilor biliari din ficat, care joacă rol de emulgatori atât pentru grăsimile ingerate cât şi pentru produşii lor de hidroliză (acizi graşi, monogliceride).

Sărurile biliare sunt deversate cu bila în duoden, împreună cu fosfolipidele polare, care au rol esenţial în solubilizarea şi incorporarea lipidelor în structuri micelare, uşor de transportat şi de absorbit prin peretele intestinal.

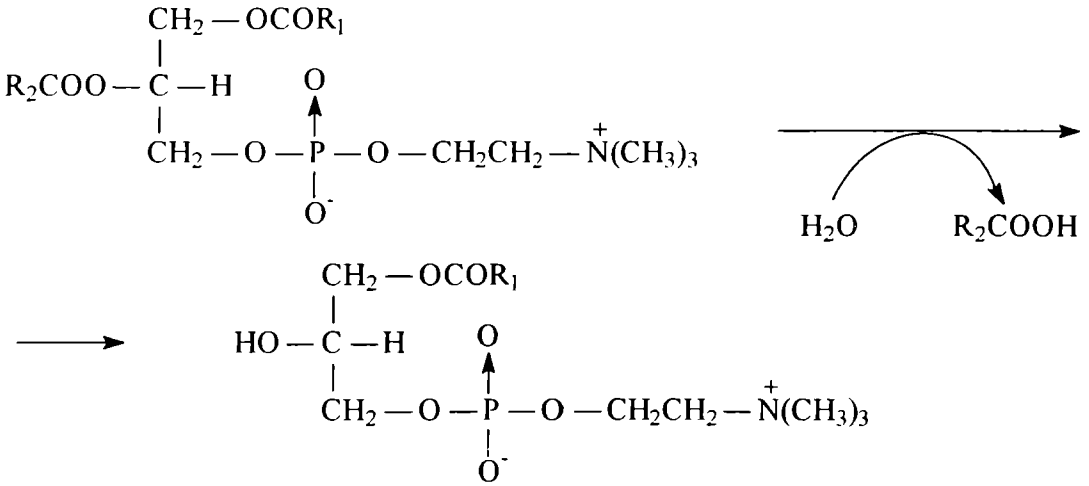
Asupra grăsimilor astfel emulsionate acţionează lipazele specifice (lipaze – pentru triacil-gliceroli; fosfolipaze – pentru fosfolipide; colesterolesteraze – pentru acilcolesteroli).

Astfel, sub influenţa enzimei triacilgliceridlipaza pancreatică, sunt hidrolizate specific legăturile esterice din poziţiile 1 şi 3 ale trigliceridelor.



Fosfolipazele cu specificitate carboxiesterazică catalizează hidroliza fosfatidelor (în principal lecitine):

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Lizolecitină

Având proprietăți tensioactive foarte puternice, lizolecitinele contribuie la solubilizarea lipidelor în intestin. În lumenul intestinal există şi colesterol (liber şi esterificat), provenit din trei surse: alimente, bilă şi descuamațiile mucoasei intestinale.

Acil-colesterolii sunt hidrolizați cu ajutorul colesterol – esterazei pancreatice. Soluția micelară formată din lipidele alimentare nehidrolizate, ca şi din produşii de hidroliză insolubili, împreună cu sărurile biliare, are un grad de dispersie din ce în ce mai mic, pe măsură ce digestia avansează. Când miceliile ating diametrul de ~ 5 nm, pătrund prin mucoasa intestinală, lipidele din micelii fiind absorbite. Sărurile biliare, rămânând în lumen, asigură solubilizarea şi transportul altor lipide de-a lungul intestinului, după care sunt absorbite în porțiunea distală a ileonului.

După absorbția prin mucoasa intestinală, produşii digestiei lipidelor sunt transformați în eritrocite în grăsimi specifice organismului (trigliceride, fosfatide, acil-colesteroli). Aceste lipide (hidrofobe sau polare) se complexează cu proteine, formând chilomicroni, care pătrund în sistemul limfatic şi apoi în circulația sanguină, spre țesuturi.

Biosinteza triacilglicerolilor are loc în toate tesuturile, dar cu precădere în țesutul adipos şi în ficat. Sinteza lor în țesutul adipos (lipogeneza) reprezintă modul de stocare a excesului energetic al organismului.

Sursele majore de lipide din tesutul adipos sunt triacilglicerolii de origine alimentară din plasmă, unde se găsesc sub formă de chilomicroni şi trigliceridele biosintetizate în ficat, care sunt prezente sub formă de VLDL. Din VLDL şi chilomicronii circulanți, sub acțiunea lipoprotein-lipazei, în țesuturile extrahepatice (adipoase, capilare, muşchii scheletului) se formează acizi graşi liberi şi glicerină. Acizii graşi traversează aceste țesuturi, iar glicerina este transportată la ficat sau rinichi.

Mobilizarea trigliceridelor stocate în țesutul adipos conduce la hidroliza lor la glicerină şi acizi graşi liberi, sub influența triacil-glicerol-lipazei hormon-senzitivă. Acizii graşi sunt complexați cu albumină (solubilă, monomeră, cu masa 66,5 kD, care reprezintă aproape jumătate din proteinele serului sanguin).

În absența albuminei, solubilitatea maximă a acizilor graşi liberi este de ~ 10^{-6}M. Peste această concentrație, acizii graşi formează micelii care acționează ca nişte detergenți, rupând structura proteinică a membranei celulare, deci au acțiune toxică. În acest caz apare

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

analbuminemia (nivel scăzut de albumină); puțini indivizi prezintă această deficiență, aparent fără simptome adverse, deoarece acizii grași pot fi transportați și prin complexare cu alte proteine serice.

Un aspect important al lumii moderne, legat de metabolismul lipidelor, este obezitatea, una dintre cele mai importante probleme de sănătate pentru țările dezvoltate, care duce la creșterea incidentei cancerului de colon și a bolilor de inimă. Orice organism animal, inclusiv cel uman, tinde să aibă o greutate stabilă. Cu toate acestea, dacă excesul de hrană este nelimitat, metabolismul este dereglat, conducând la o creștere aberentă a greutății corporale, chiar cu mai mult de 100 kg peste greutatea normală.

Într-un organism normal se stabilește un echilibru între cantitatea de acizi grași proveniți din digestia lipidelor și cei eliberați din țesutul gras, prin hidroliza enzimatică a trigliceridelor. Astfel, aproximativ 50% din acizii grași formați prin scindarea trigliceridelor sunt reesterificați, înainte ca aceștia să poată fi eliberați din adipocite. În cazul subiectilor obezi, proporția este de 35 – 40%, un nivel similar cu cel observat la indivizii normali, după câteva zile de abuz alimentar.

În consecință, pentru că celulele grase (altfel destul de elastice) au aceleași dimensiuni atât la indivizii normali cât și la cei obezi, la aceștia din urmă se vor forma în număr mai mare. Din nefericire, celulele grase, odată câștigate, nu mai pot fi diminuate ca număr, ceea ce sugerează că adipocitele tind să-și mențină un volum fix și influențează astfel metabolismul și apetitul.

Dietele pot conduce la o micșorare a volumului celulelor grase, numărul lor rămânând constant; reluarea obișnuințelor alimentare va avea deci drept consecință reapariția obezității la persoanele cu această tendință.

La fel de dăunător se dovedește a fi și consumul deficitar de grăsimi, observat la populațiile din zone cu resurse alimentare insuficiente. Principala consecință este apariția deficienței în vitamine liposolubile, din cauza lipsei lipidelor din rația alimentară, dar și a altor substanțe fiziologic active (acizi grași esențiali, caroteni etc.). Aceste deficiențe provoacă apariția unor boli grave: modificări cutanate severe, rahitism, întârzieri de creștere și dezvoltare, tulburări nervoase, oculare și hormonale etc.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV. ACIZI NUCLEICI

Acizii nucleici reprezintă o clasă de biomolecule formate prin polimerizarea unor unități structurale constitutive numite mononucleotide, care constituie suportul fundamental al programului genetic al organismelor vii.

Masa moleculară a acizilor nucleici poate depăși 10^6. Rolul lor este hotărâtor în depozitarea și transferul informației genetice necesare biosintezei proteinelor specifice.

În celulele vii, acizii nucleici se găsesc sub formă liberă și, mai ales, sub formă de conjugate cu proteinele (nucleoproteine).

Acizii nucleici au două forme structurale fundamentale: ADN (acizi dezoxiribonucleici) și ARN (acizi ribonucleici).

În esență, ADN determină proprietățile celulelor vii prin:

- controlul sintezei proteinelor specifice și
- stocarea și transferul mesajului biologic de la o generație la alta (transmiterea informației genetice ereditare).

Fiecare celulă a unui organism conține înscrisă în ADN-ul celular ("genom") totalitatea informațiilor necesare îndeplinirii funcțiilor organismului. Datorită structurii chimice, ADN prezintă o capacitate informațională imensă.

În afară de păstrarea informației genetice, ADN are și o capacitate înaltă de codificare, esențială pentru "traducerea" informației în proteine, fiind baza chimică a eredității. În consecință, multiplicarea celulelor prin diviziune înseamnă și multiplicarea informației genetice.

Pe treptele superioare ale dezvoltării speciilor apare diferențierea celulară; celulele se specializează folosind numai anumite părți ale totalului informației stocate.

ARN au o structură în parte asemănătoare cu cea a ADN, dar posedă funcții diferite în celulă: rol structural, interacție extensivă cu proteine specifice, funcții catalitice în sinteza unor structuri de înaltă complexitate.

ARN poate transcrie și transporta informația genetică preluată de la ADN, proces esențial în biosinteza proteinelor specifice. Exprimarea informației genetice cuprinse într-o moleculă de ADN, în secvențe specifice de aminoacizi (din proteine) cuprinde două procese:

a) transcrierea, care constă în rescrierea unor părți (codificate) din mesajul genetic sub forma unui ARN mesager (ARNm), care preia din nucleu mesajul genetic, pentru biosinteza unei proteine și-l aduce în citoplasmă, unde are loc biosinteza proteinelor;

b) traducerea mesajului genetic din ARNm se exprimă într-o secvență de aminoacizi, conform codului genetic. Amplasarea aminoacizilor într-o secvență specifică de proteine (codificată de un fragment de ARNm) este asigurată de ARN de transfer (ARNt).

Fiecare moleculă de ARNt este capabilă de a fixa specific unul dintre cei 20 aminoacizi naturali standardizați din compoziția proteinelor, transferându-l pe lanțul de sinteză a unei proteine (într-o ordine determinată de ARNm), unde va fi luat în primire de un ribozom.

ARN ribozomial (ARNr), transcris într-o regiune specială a nucleului ("nucleol"), este conținut apoi în ribozom. Fiecare ribozom conține, în afară de proteine, și trei ARNr diferiți. Ribozomii, fiind foarte numeroși în celulă, ARNr reprezintă 80% din ARN-ul total.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În unele virusuri (HIV sau în virusul mozaicului tutunului), ARN constituie materialul ereditar (genomul).

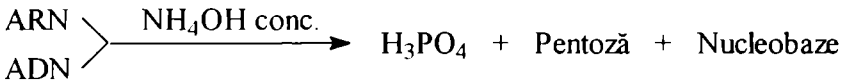
Spre deosebire de procariote, unde localizarea acizilor nucleici nu ține de o anumită structură morfologică, la eucariote ei sunt localizați mai ales în nucleele celulare și doar în cantități reduse în citoplasma celulară, mitocondrii și plasmide (molecule circulare de ADN extracromozomic, foarte frecvente în bacterii).

Acizii nucleici izolați din diverse surse biologice sunt substanțe incolore sau slab gălbui, sub formă de pulbere. Sunt puțini solubili în apă, dar se dizolvă în soluții alcaline în care formează dispersii coloidale. Din aceste dispersii, acizii nucleici se precipită în prezența acizilor organici și (sau) anorganici.

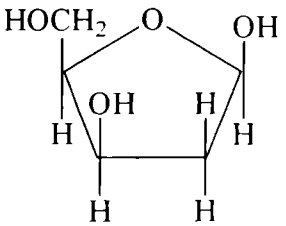
IV.1. Compoziția chimică a acizilor nucleici

Acizii nucleici se extrag din materialele biologice cu apă, cu soluții alcaline sau cu soluții de detergenți (care denaturează proteinele însoțitoare), sau prin metode mai puțin distructive (evitându-se fragmentarea avansată a moleculelor) ca tehnicile de microdisecție a celulelor. Separarea lor s-a făcut prin ultracentrifugare.

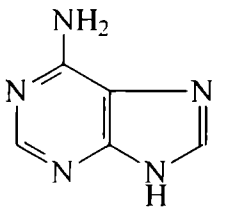
Compoziția chimică a acizilor nucleici a fost evidențiată prin scindare hidrolitică, chimică sau enzimatică. Astfel, prin hidroliza totală cu amoniac concentrat, se obțin trei categorii de produși, constituenți de bază ai acizilor nucleici: acid fosforic, o pentoză și un număr total de cinci baze organice azotate, nucleobaze, denumite după scheletele heterociclice de la care provin baze pirimidinice și purinice:



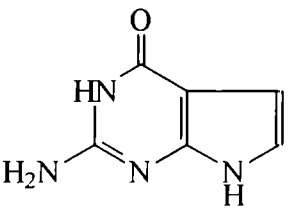
În cazul ADN, pentoza specifică este 2-deoxi-D-riboza, iar bazele organice azotate sunt: adenina (A), guanina (G) – baze purinice, citosina (C) și timina (T) – baze pirimidinice:



2-Deoxi-D-riboza

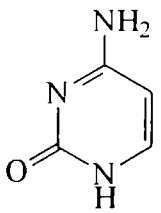


Adenina (A)

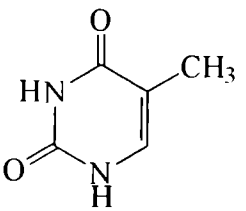


Guanina (G)

Baze purinice



Citosina (C)

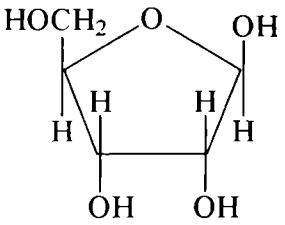


Timina (T)

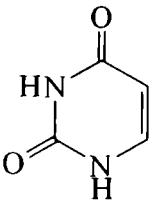
Baze pirimidinice

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În aceleași condiții, de la ARN se obțin: D-riboza, adenina (A), guanina (G), citosina (C) și uracilul (U).



D-riboza



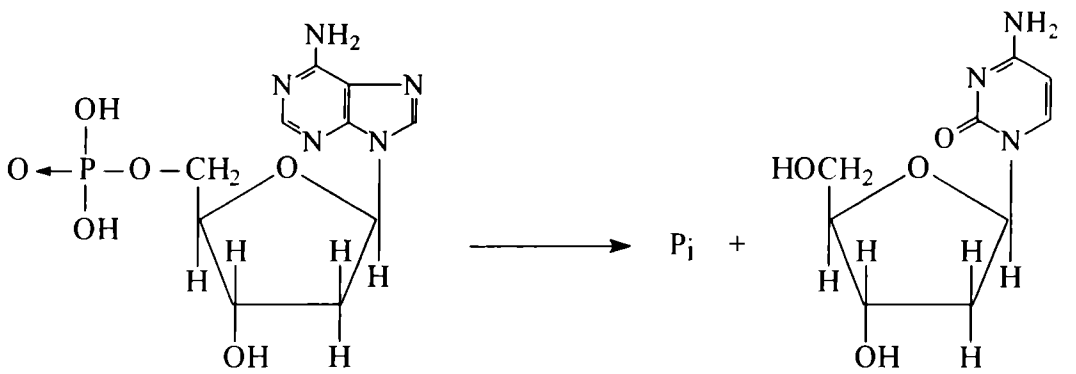
Uracil (U)

Bază pirimidinică

Prin hidroliza menajată (cu amoniac diluat sau în prezența enzimelor nucleaze), acizii nucleici conduc la un amestec de compuși cu caracter acid, denumiți mononucleotide. Fiecare mononucleotidă conține o moleculă de nucleobază (purinică sau pirimidinică), o unitate fosfat și o unitate de pentoză.

La rândul său, unitatea fosfat poate fi detașată în condiții de hidroliză blânde, cu ajutorul unei nucleotidaze specifice. În aceste condiții, nucleotida se transformă în nucleosidă (o asociere dintre o pentoză și o nucleobază).

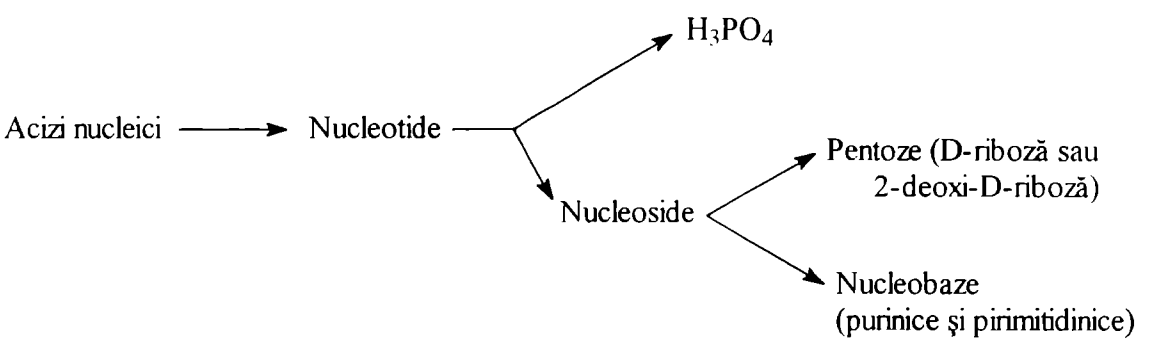
De exemplu, acidul adenilic (adenin-mononucleotida) sau acidul deoxicitidilic (citidin-mononucleotida) sunt nucleotide, în timp de adenosina și deoxicitidina (care se obțin prin detașarea unui rest fosfat de la nucleotidele corespunzătoare) sunt nucleoside:



Acid deoxicitidilic
(citidin-mononucleotida)

Deoxicitidină

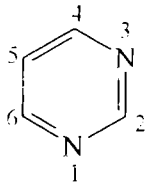
Schematizând, etapele scindării hidrolitice a acizilor nucleici se pot reprezenta astfel:



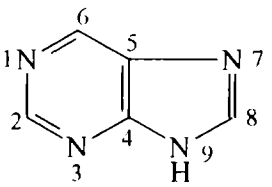
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.1.1. Baze organice azotate

Aceşti compuşi, denumiţi frecvent şi nucleobaze, derivă de la două structuri heterociclice: pirimidina şi purina:



Pirimidina



Purina

După cum s-a amintit anterior, bazele pirimidinice din acizii nucleici sunt:

- 2-hidroxi-4-amino-pirimidina sau citosina (C);
- 5-metil-2,4-dihidroxi-pirimidina sau timina (T);
- 2,4-dihidroxi-pirimidina sau uracil (U).

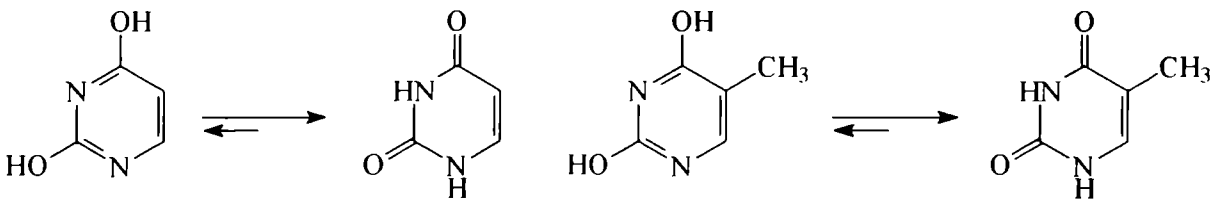
Bazele purinice prezente atât în ADN cât şi în ARN sunt:

- 6-amino-purina sau adenina (A) şi
- 2-amino-6-hidroxipurina sau guanina (G).

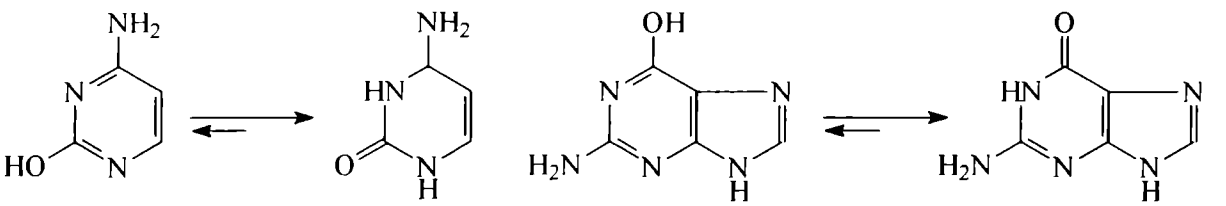
Atât nucleobazele pirimidinice cât şi cele purinice care conţin grupe OH prezintă tautomeria de tip lactam – lactim:

Lactam Lactim

Tautomerii lactamici sunt mai stabili decât cei lactimici, la care grupa –OH şi dubla legătură sunt plasate la acelaşi atom de carbon:



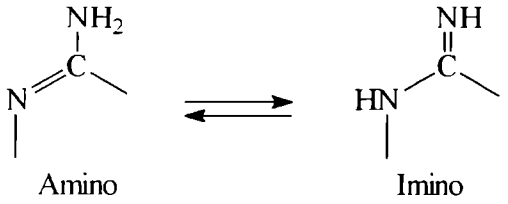
Uracil Timină



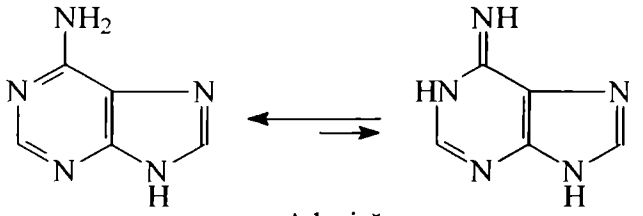
Citosină Guanină

Adenina, care nu conţine grupe –OH, poate prezenta tautomeri amino-imino, echilibrul fiind net deplasat spre tautomerul amino:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

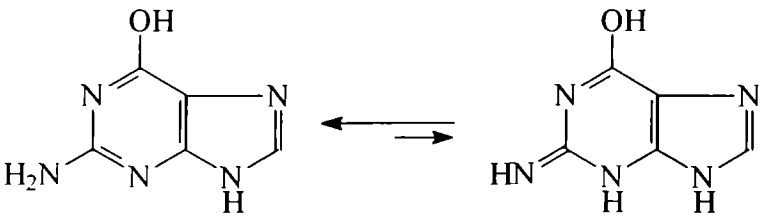


Amino Imino



Adenină

În plus, guanina fiind o hidroxiamino-purină, poate prezenta pe lângă tautomeria lactam-lactim şi pe cea amino-imină, echilibrul fiind net deplasat spre tautomerul aminic:



Guanina

Echilibrul dintre tautomeri poate fi deplasat în favoarea unuia dintre ei în prezența unui reactant specific acestuia.

După cum s-a mai arătat, uracilul este baza pirimidinică specifică ARN, în timp ce timina este specifică ADN.

Datorită prezenței heterociclilor, moleculele bazelor azotate au o structură plană, sunt nemiscibile cu apa şi absorb în UV la λ = 252 – 271 nm. Maximul absorbției caracteristice depinde de natura nucleobazei ca şi de pH, ceea ce foloseşte la dozarea acizilor nucleici şi la studiul conformației acestora.

Citosina a fost descoperită printre produşii de hidroliză ai acidului timonucleic (A. Kossel şi A. Neuman, 1894). Este mai bazică decât uracilul, are şi un slab caracter acid, datorită prezenței grupei hidroxil din poziția 2 a tautomerului lactimic.

Uracilul a fost izolat în 1900 de A. Ascoli din acizii nucleici din drojdie. Este mai puțin bazic decât citosina, deoarece posedă două grupe –OH în 2 şi 4 în ciclul pirimidinic al formei lactimice.

Timina a fost izolată din hidrolizatele acide de timus (A. Kossel şi A. Neuman, 1893) şi ulterior din extracte de ADN (Mandel şi Borek, 1961).

Adenina a fost pusă în evidență pentru prima oară în țesuturile pancreatice (A. Kossel, 1885). Este mult mai solubilă în apă decât purina nesubstituită, la care raportul purină/apă este ½ (tabel nr. IV.1).

Adenina formează săruri stabile cu acizii minerali, dar se dizolvă şi în soluții bazice (amoniac, hidroxizi alcalini).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. IV.1

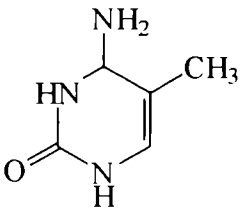
Caracteristici ale bazelor organice azotate din compoziția acizilor nucleici

Nucleobaze	Simbol	Formula brută	Masa moleculară	Solubilitate baze/apă
Citosina	C	$C_4H_5N_3O$	111,11	1:120
Uracil	U	$C_4H_4N_2O_2$	112,09	1:280
Timina	T	$C_5H_6N_2O_2$	126,12	1:250
Adenina	A	$C_5H_5N_5$	135,13	1:1,086
Guanina	G	$C_5H_5N_5O$	151,14	1:26000

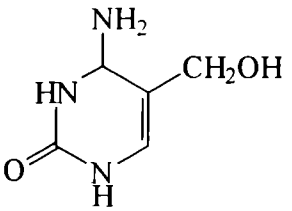
Guanina, izolată inițial din guano (B. Unger, 1846), este foarte puțin solubilă în apă și insolubilă în alcool și eter; în schimb, se dizolvă în acizi și alcalii.

În afara celor cinci nucleobaze menționate, se mai pot întâlni în compoziția unor acizi nucleici și mici cantități de baze organice "minore", ca:

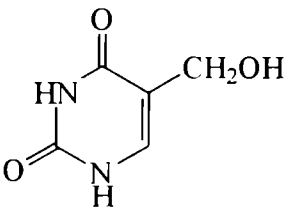
- 5-metilcitosina (5MC) din țesuturi animale și vegetale;
- 5-hidroximetilcitosina (5HMC) din bacteriofagul de tip T al bacteriei *Escherichia coli*;
- 5-hidroximetiluracil (5HMU) din bacteriofagul din seria SP8;
- 5-halogeno-uracil (cu Br sau F);
- 5-bromocitosina;
- 2-metiladenina (2MA) din pneumococi și unele bacterii;
- 6-metilaminopurina, cu incidență foarte redusă.



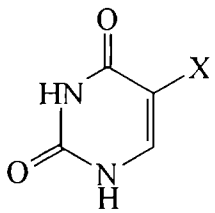
5-Metilcitosina (5MC)



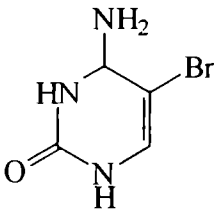
5-Hidroximetil-citozina (5HMC)



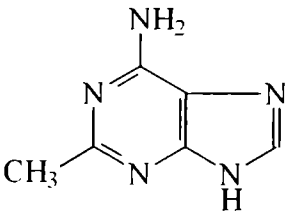
5-Hidroximetil-uracil (5HMU)



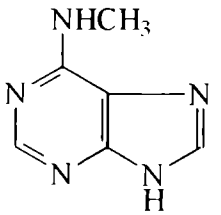
5-Halogenouracil X = F, Br



5-Bromocitosină



2-Metiladenina (2MA)



2-Metilaminoapurina

"Bazele minore" prezintă interes în special pentru cercetările de biologie moleculară, legate de patogeneza indusă de agenți fizici și chimici.

IV.1.2. Nucleoside

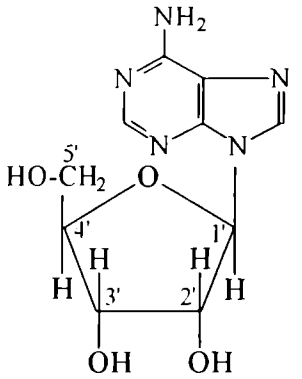
Nucleosidele sunt derivați N-glicozidici ai D-ribozei sau 2-deoxi-D-ribozei, cu bazele purinice și pirimidinice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

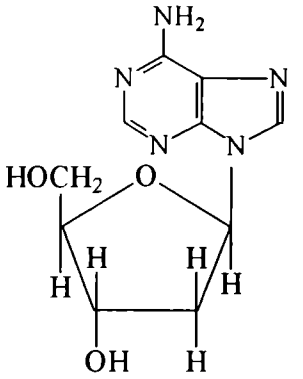
Legătura dintre componenta glucidică şi nucleobază este de tip β-N-glicozodic.

Pentru nucleosidele formate din baze purinice, legătura glicozidică intervine între atomul C_1' al pentozei şi atomul N_9 al bazei, iar în cazul nucleosidelor derivate de la bazele pirimidinice, pentoza se leagă prin atomul C_1' de atomul N_1 al bazei.

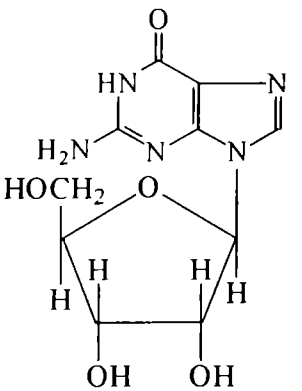
Denumirile nucleosidelor depind de structura lor. Astfel, cele derivate de la bazele purinice primesc sufixul "osină" la rădăcina care desemnează nucleobaza, iar cele de la bazele pirimidinice – sufixul "idină". După natura pentozei, pentru nucleosidele care conţin 2-deoxi-D-riboza se utilizează la rădăcina care desemnează baza prefixul 2-deoxi. În mod frecvent, se utilizează prescurtări simbolice (tabelul nr. IV.2).



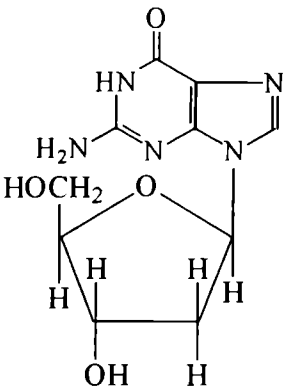
Adenosină
A



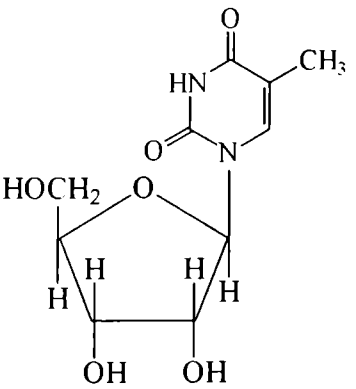
2'-Deoxiadenosină
dA



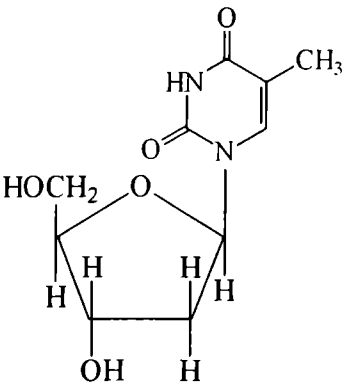
Guanosină
G



2'-Deoxiguanosină
dG

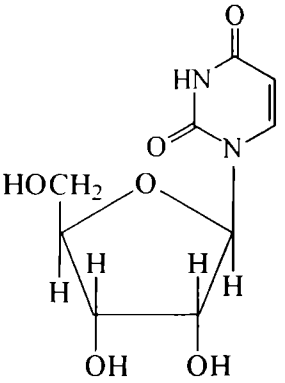


Timidină
T

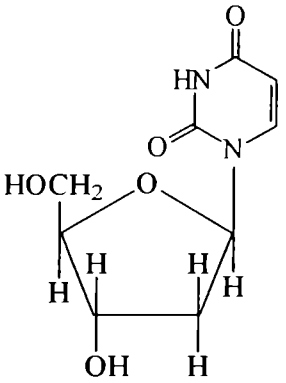


2'-Deoxitimidină
dT

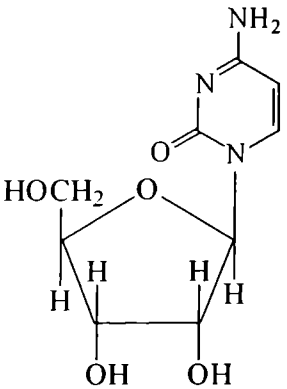
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



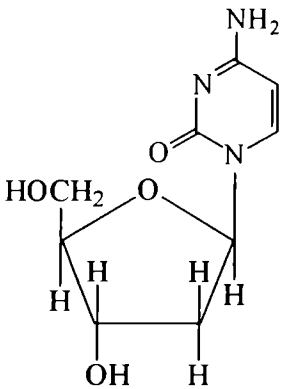
Uridină
U



2'-Deoxiuridină
dU



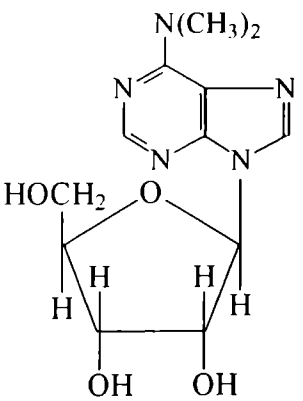
Citidină
C



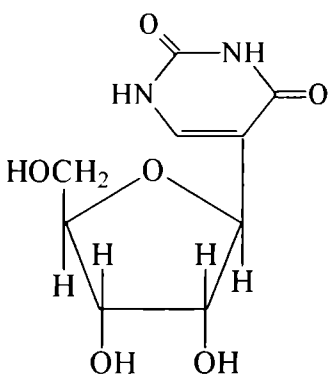
2'-Deoxicitidină
dU

Atât bazele azotate cât şi mononucleosidele se găsesc libere în celule numai în cantităţi mici, ca produşi de hidroliză ai acizilor nucleici. De asemenea, nucleosidele mai intră şi în compoziţia mono-, di- şi trifosfat-nucleotidelor (IV.1.3) ca şi în moleculele unor vitamine sau coenzime (NAD şi NADP – formele reduse şi oxidate, FAD, coenzima A etc.). Nucleosidele mai apar şi ca intermediari în reacţii de biosinteză şi degradare a nucleotidelor, sau chiar în glicozide cu structuri complexe, ca antibioticul puromicina, sau S-adenosilmetionina.

În situaţii neobişnuite, legătura dintre pentoză şi baza azotată se face prin intermediul unui atom de carbon al acesteia din urmă, ca în cazul pseudouridinei, componentă a acidului pseudouridilic, izolat din ARNt.



Puromicina



Pseudouridina

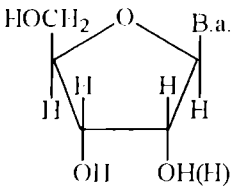
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Nucleosidele sunt substante solide, incolore, solubile în solvenți organici. Ele au atât proprietăți bazice (datorită grupelor $-NH_2$ și atomilor de N din heterociclii respectivi) cât și slab acide (în special în cazul prezenței substituenților –OH din nucleele heterociclice).

Nucleosidele prezintă activitate optică și absorb în UV; unele dintre ele, fie naturale (de extracție), fie de sinteză, au activitate bactericidă sau antitumorală.

Tabelul nr. IV.2

Principalele nucleoside din componența acizilor nucleici



Pentoza	Baza azotată (B.a.)	Denumire	Prescurtare
D-Riboza	Adenină	Adenosină	A
	Guanină	Guanosină	G
	Citosină	Citidină	C
	Uracil	Uridină	U
2-Deoxi-D-riboza	Adenină	Deoxiadenosină	dA
	Guanină	Deoxiguanosină	dG
	Citosină	Deoxicitidină	dC
	Timină	Deoxitimidină	dT

IV.1.3. Nucleotide

Nucleotidele sunt esteri fosforici (fosfați) ai nucleosidelor, resturile fosfat fiind legate la atomul C_5· din pentoză.

Din această clasă fac parte atât mononucleotidele (conținând câte un mol de pentoză, fosfat și nucleobază) cât și compușii rezultați prin fosfatarea sau policondensarea mononucleotidelor (derivați nucleotidici).

În mononucleotide aciclice, grupa fosfat este legată la o singură grupă –OH din restul de pentoză. În derivații nucleotidici, esterificarea mononucleosidelor cu grupa fosfat are loc și la alte grupe –OH din restul de pentoză, ca în mononucleotidele ciclice.

Prin policondensarea mononucleotidelor se pot forma polinucleotide (omogene și heterogene) și acizi nucleici. Deci mononucleotidele sunt unități structurale care compun biomoleculele acizilor nucleici.

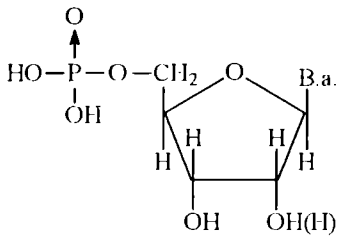
IV.1.3.1. Mononucleotide aciclice

După natura pentozei constituente, mononucleotidele se subclasifică în ribonucleotide și deoxiribonucleotide (tabel nr. IV.3).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. IV.3

Principalele mononucleotide aciclice din compoziția acizilor nucleici



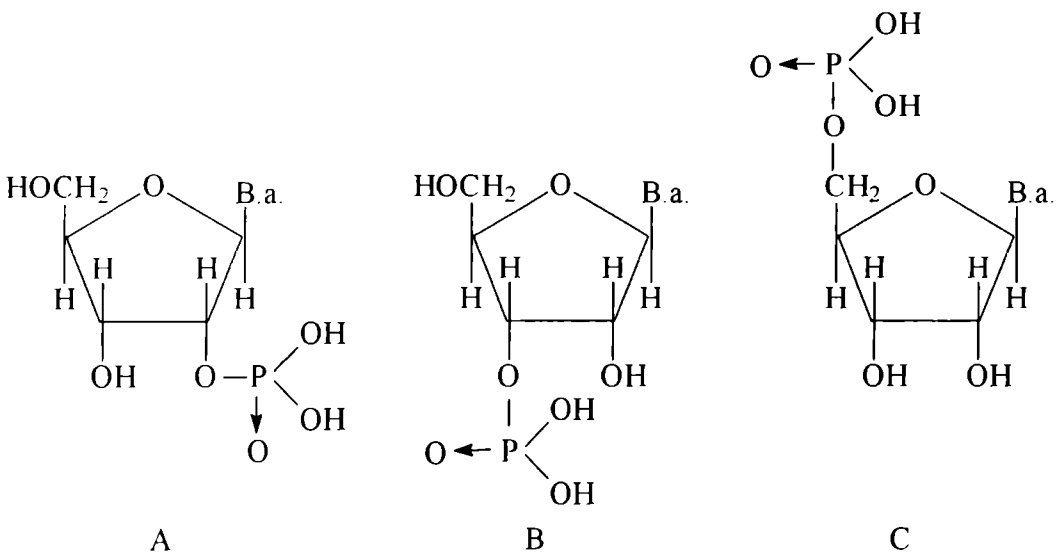
Pentoza	Baza azotată (B.a.)	Denumire	Prescurtare
D-Riboza	Adenină	Acid adenilic (adenosin-5'-monofosfat)	AMP
	Guanină	Acid guanilic (guanosin-5'-monofosfat)	GMP
	Citosină	Acid citidilic (citidin-5'-monofosfat)	CMP
	Uracil	Acid uridilic (uridin-5'-monofosfat)	UMP
2-Deoxi-D-riboza	Adenină	Acid deoxiadenilic (deoxiadenosin-5'-monofosfat)	dAMP
	Guanină	Acid deoxiguanilic (deoxiguanosin-5'-monofosfat)	dGMP
	Citosină	Acid deoxicitidilic (deoxicitidin-5'-monofosfat)	dCMP
	Timină	Acid deoxitimidilic (deoxitimidin-5'-monofosfat)	dTMP

Acidul fosforic poate esterifica şi grupele hidroxi din 2' şi 3' ale ribozei (pentru ribonucleotide) ca şi din poziția 3' a deoxiribozei (pentru deoxiribonucleotide). Astfel, AMP (acidul adenilic) s-a izolat din țesuturi sub formă de acid adenosin-5'-fosforic, iar din drojdii – ca acid adenosin-3'-fosforic.

În fig. IV.1 sunt schematizate principalele tipuri de esteri fosforici ribonucleotidici (A, B, C) şi deoxiribonucleotidici (D, E).

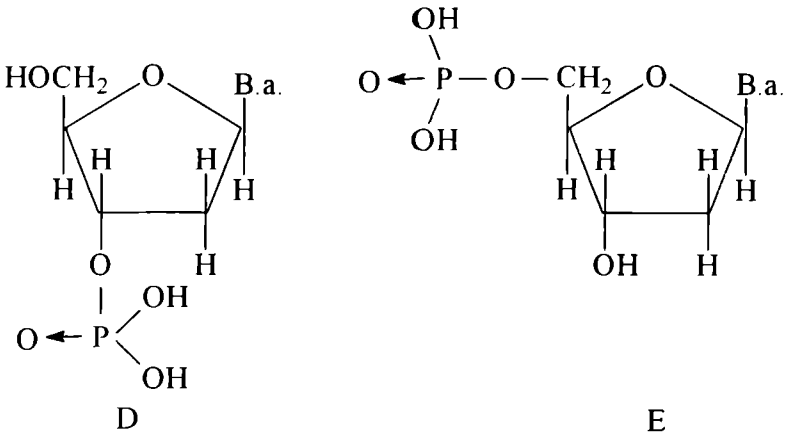
Fig. IV.1

Tipuri generale de mononucleotide aciclice



Monoribonucleotide aciclice

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



D E

Monodeoxiribonucleotide aciclice

B.a. = baza azotată

După cum s-a arătat în tabelul nr. IV.3, cele mai frecvente mononucleotide prezente în acizii nucleici conțin restul fosfat la grupa –OH din poziția 5' a pentozei (C şi E).

Nomenclatura mononucleotidelor se constituie în functie de natura pentozelor constituente şi a bazelor azotate din moleculă (tabel nr. IV.3):

- din punct de vedere al pentozei, se vor întâlni ribonucleotide (ribotide) şi deoxiribonucleotide (deoxiribotide).

- în funcție de bazele azotate, pot exista pirimidinnucleotide şi purinnucleotide.

Fiind derivați fosforilați ai mononucleosidelor şi deci având caracter acid datorită restului fosfat, mononucleotidele au fost denumite şi acizi (tabel nr. IV.3): acid citidilic (CMP) de la citidină, acid adenilic (AMP) de la adenosină etc.

În functie de natura pentozei, se plasează în fața notării abreviate un *r* (pentru ribotide) sau un *d* (pentru deoxiribotide): rCMP şi dCMP, rAMP şi dAMP etc.

O variantă simplificată ignoră menținerea literei r pentru ribotide, dar scrie litera d pentru deoxiribotide (tabel nr. IV.3): CMP şi dCMP, AMP şi dAMP etc.

În fine, o denumire completă va indica şi poziția grupei OH fosfatate din pentoză; de exemplu: C5'-mononucleotide (nucleosid-5'-monofosfați), C3'-mononucleotide (nucleosid-3'-monofosfați) etc.

Mononucleotidele sunt substanțe solide, incolore, solubile în apă şi insolubile în solvenți organici. Datorită resturilor de acid fosforic, au propritetăți acide, formând săruri cristaline cu ionii K^+, Na^+, Ba^{2+}. La pH=7, toate resturile de acid fosforic sunt ionizate.

Ca şi nucleosidele, nucleotidele prezintă activitate optică. Hidroliza lor la nucleoside are loc intracelular, sub influența nucleotidazelor specifice.

Biosinteza "de novo" a mononucleotidelor are loc din precursori simpli, în urma unor reacții multisecvențiale, cu consum considerabil de energie, mai ales sub formă de ATP.

Spre deosebire de celulele procariote, în celulele eucariote, această sinteză implică cel puțin două secvențe reacționale controlate de sisteme enzimatice multifuncționale.

În organismele animalelor superioare, aproape toate tipurile de celule pot biosintetiza mononucleotide, enzimele specifice fiind localizate în nucleu şi în mitocondrii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

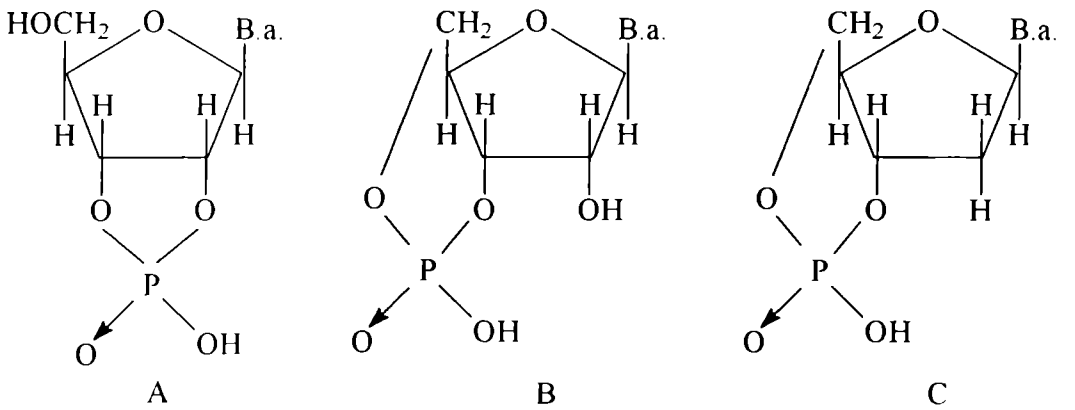
O excepție o reprezintă eritrocitele, care nu-şi pot sintetiza mononucleotidele necesare, pe care le iau din fluxul sanguin.

Nucleosidele şi bazele organice azotate rezultate din catabolizarea nucleotidelor sunt recuperabile şi vor fi utilizate pentru biosinteza unor noi nucleotide specifice, cu consum de energie mai mic decât în cazul biosintezei "de novo".

Dinamica metabolică a mononucleotidelor depinde atât de tipul de celule şi de specie cât şi de scindarea enzimatică a acizilor nucleici exogeni (din alimentație).

IV.1.3.2. Mononucleotide ciclice

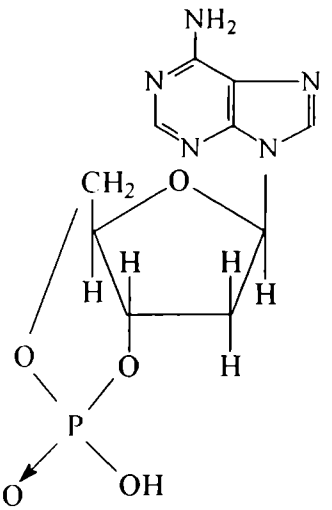
În afară de mononucleotidele aciclice, există şi mononucleotide ciclice, în care acelaşi rest de acid fosforic esterifică simultan două grupe –OH din pentoză. Astfel, din riboză pot fi esterificate simultan pozițiile C2' şi C3' (A) sau C3' şi C5' (B), iar din deoxiriboză – pozițiile C3' şi C5' (C):



Mononucleotide ciclice

Mononucleotide ciclice de forma A, B, C au fost izolate la hidroliza acizilor nucleici.

Unele dintre ele pot exista şi în stare liberă, ca acidul 3',5'-ciclodeoxiriboadenilic (acidul adenosin-3',5'-monofosforic ciclic), notat cu cAMP:



cAMP (Acid 3',5'-ciclodeoxiribonucleic sau
acid adenosin-3',5'-monofosforic ciclic)

Se observă că în nomenclatura acestor compuşi se foloseşte litera *c*, amplasată înaintea denumirii cere defineşte natura nucleotidei.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

O serie de nucleotide ciclice îndeplinesc roluri foarte importante în țesuturi. Astfel, cAMP mediază acțiunea unor hormoni care nu traversează membrana celulară.

IV.1.3.3. Derivați nucleotidici

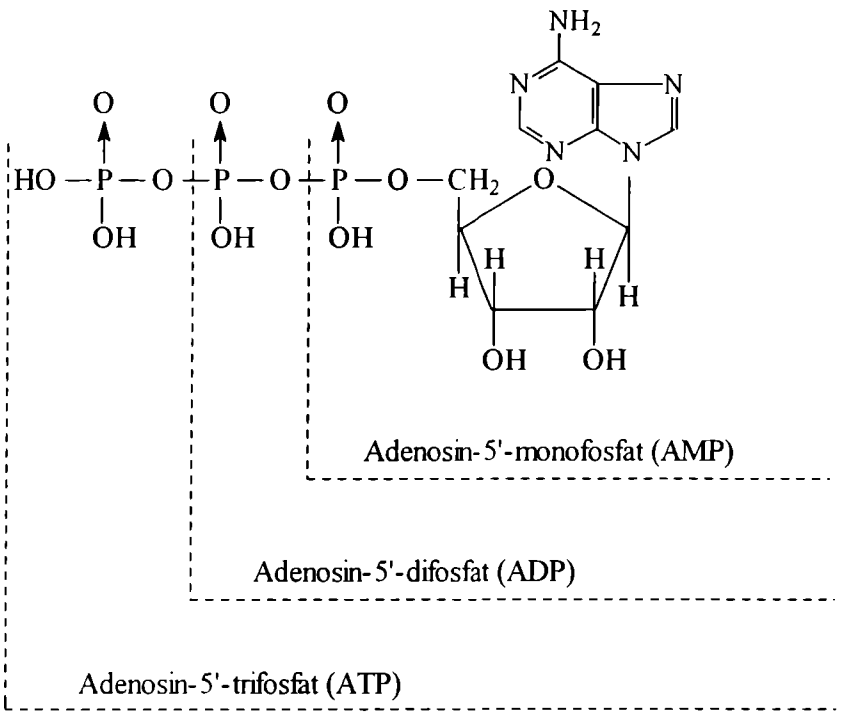
Pot exista, în principal, două categorii de derivați nucleotidici:

- nucleosid-polifosfați, formați prin di- și trifosforilarea mononucleosidelor;
- polinucleotide, formate prin policondensarea homo- sau hetero- mononucleotidelor.

A. Nucleosid-polifosfați

Aceşti compuşi rezultă prin ataşarea a două sau trei resturi de acid fosforic la nucleoside.

Între resturile de acid fosforic se formează legături macroergice (Lipman, 1941), cu potențial energetic ridicat, care prin scindare eliberează mari cantități de energie. De exemplu, adenosin-5'-difosfatul (ADP) şi adenosin-5'-trifosfatul (ATP), ca şi alte molecule analoage, iau parte la transformări biochimice în care au loc schimburi de energie.



Prin hidroliză, legătura macroergică din ATP eliberează o energie de 33,5kJ/mol (7-9 kcal/ mol fosfat), în timp de legătura microergică din AMP eliberează 17kJ/mol (2- 3 kcal/mol fosfat):

$$ATP + H_2O \underset{\text{acumulator de energie}}{\overset{\text{generator de energie}}{\rightleftharpoons}} ADP + P_i + \text{Energie}$$

Acest exemplu ilustrează potențialul energetic al celulei, necesar pentru desfășurarea proceselor vitale.

Proprietatea unor nucleotide de a exista în stadii diverse de fosforilare, pe baza căreia participă la reacții biochimice în care au loc schimburi energetice sau în care pot fi furnizori sau acceptori de resturi fosfat, ca şi participarea lor la structurarea unor vitamine sau coenzime, le

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

recomandă ca substanțe cu activitate biologică remarcabilă. Astfel, ADP și ATP intervin în procesul fosforilării oxidative; ATP este precursor în biosinteza acizilor nucleici; ATP și ADP au un rol însemnat în fotosinteză, glicoliză, fermentația alcoolică etc.

ADP face parte din structura unor nucleotid-coenzime ca: NAD, NADP, FAD (forme reduse și oxidate), coenzima A. ATP joacă și rol de combustibil energetic în etapa acilării aminoacizilor implicați în sinteza proteinelor, care are loc în citoplasmă.

B. Polinucleotide

Polinucleotidele se formează din mononucleotide, fie prin sinteză organică, fie prin procesele biosintetice din organismele vii.

În funcție de natura mononucleotidelor care intră în compoziția lor, polinucleotidele pot fi:

- homopolinucleotide (omogene), formate din aceleași unități mononucleotidice;
- heteropolinucleotide (heterogene), formate din unități mononucleotidice diferite.

Atât la sinteza cât și la biosinteza acestora participă nucleosidtrifosfații (ca precursori) și enzime specifice.

B.1. Homopolinucleotide

Acești compuși se obțin în laborator plecând de la CMP și AMP (în care pentoza poate fi riboza sau deoxiriboza):

$$nCMP \xrightarrow[-(n-1)H_2O]{} \underset{\text{Poli(CMP)}}{(CMP)_n}$$

$$nAMP \xrightarrow[-(n-1)H_2O]{} \underset{\text{Poli(AMP)}}{(AMP)_n}$$

în care n = gradul de polimerizare.

B.2. Heteropolinucleotide

Aceste polinucleotide pot fi naturale (acizii nucleici) sau de sinteză.

Heteropolinucleotidele de sinteză, utilizate de obicei în scopuri experimentale, se obțin din două sau mai multe mononucleotide diferite:

$$nAMP + nTMP \xrightarrow[-(n-1)H_2O]{} \underset{\text{Poli(AMP,TMP)}}{(AMP - TMP)_n}$$

Ca materii prime se utilizează mononucleosidele trifosfatate (specifice ADN și ARN), obținându-se heteropolinucleotidele de interes biologic. Astfel, pentru sinteza sau biosinteza ADN, substratele vor fi: dATP, dTTP, dGTP și dCTP, în prezența ionilor Mg^{2+}:

$$n_1dATP + n_1dTTP + n_2dGTP + n_2dCTP \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons^{Mg^{2+}} \left[\begin{array}{c} dAMP \\ | \\ dTMP \\ | \\ dGMP \\ | \\ dCMP \end{array}\right] + 2(n_1+n_2)O \leftarrow \begin{array}{c} OH \\ | \\ P-OH \\ | \\ O \\ | \\ O \leftarrow P-OH \\ | \\ OH \end{array}$$

Acid pirofosforic (PPi)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Reacția are loc în prezența ADN polimerazei și a unei cantități mici de ADN ca inițiator. Polinucleotidele de sinteză au fost utilizate la determinarea codului genetic.

IV.1.3.4. Nucleotid-coenzime

Deși acești cofactori au în linii mari structură de nucleosid-fosfați, dată fiind importanța lor deosebită în procesele biosintetice din celulele vii, sunt tratate separat în acest subcapitol.

În secțiunea II.3.6.4 s-a arătat că unele clase de enzime (oxidoreductaze, liaze, ligaze, transferaze) implică participarea la reacții a unor cofactori (coenzime), în lipsa cărora reacțiile respective, defavorizate termodinamic, nu ar putea avea loc. Acești cofactori, cu structură diferită de a proteinelor sunt mult mai stabili decât enzimele.

Enzimele dependente de cofactori sunt legate de coenzime pe baza unor grade variate de afinitate. În majoritatea cazurilor, coenzima este legată de enzimă prin legături slabe, necovalente și se poate separa de aceasta prin dializă. Unele coenzime pot fi însă legate și covalent de apoenzimă, reprezentând partea prostetică a enzimei respective.

Funcția uzuală a coenzimelor este cea de purtător intermediar de electroni, atomi sau grupe funcționale, care sunt transferate pe substrate în cursul reacțiilor enzimatice.

În tabelul nr. IV.4 sunt listate principalele coenzime cunoscute, ca și reacțiile enzimatice la care participă.

Tabelul nr. IV.4

Coenzime implicate în reacții enzimatice de transfer

Entitatea transferată	Coenzima
Atomi de H (electroni)	NAD
Atomi de H (electroni)	NADP
Atomi de H (electroni)	FMN
Atomi de H (electroni)	FAD
Atomi de H (electroni)	Coenzima Q (ubichinona)
Aldehide	Tiaminpirofosfat
Grupe acil	Coenzima A (CoASH)
Grupe acil	Lipoamida (lipolisina)
Grupe alchil	Coenzime cobaminice
CO_2	Biocitină
NH_2	Piridoxalfosfat
Grupe CH_3, CH_2, CHO sau formimino	Coenzimele de tip tetrahidrofolat

Dintre acești cofactori, se încadrează în grupa coenzimnucleotidelor: NAD (forma redusă și oxidată), NADP (forma redusă și oxidată), FMN (forma redusă și oxidată), FAD (forma redusă și oxidată), toate fiind specifice oxidoreductazelor, ca și coenzima A care participă la transfer de grupe acil pe diverse substrate.

Se cunosc în principal trei clase de oxidoreductaze dependente de cofactori care participă la transportul electronilor de la substratele organice la oxigenul molecular:

- dehidrogenaze piridin-dependente (care conțin NAD sau NADP drept cofactori);

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- dehidrogenaze flavin-dependente (care conțin ca grupe flavin-coenzimele FMN sau FAD);

- citocromii, care conțin un sistem ciclic fiero-porfirinic (hemul).

A. Piridin-nucleotide

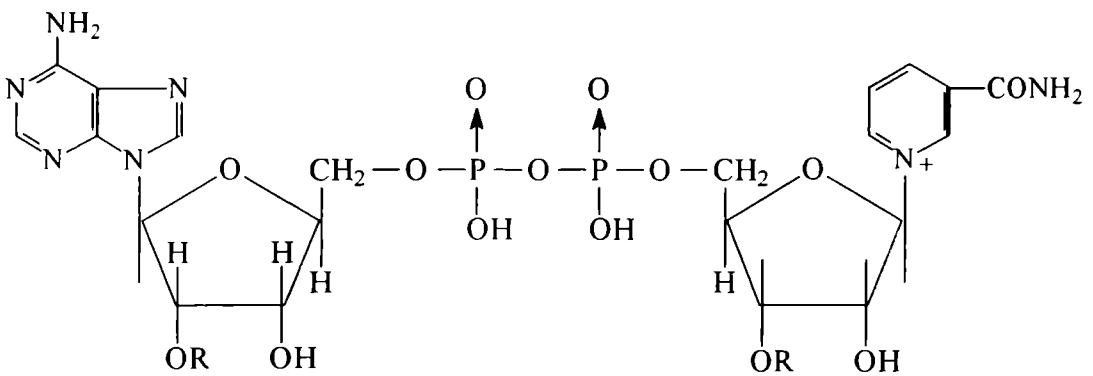
Dehidrogenazele piridin-dependente implică prezența NAD sau (şi) NADP, cu structură dinucleotidică, care conțin câte un rest de adenină şi un rest de nicotinamidă. Se cunosc peste 150 de asemenea enzime, unele fiind exemplificate în tabelul nr. IV.5.

Tabelul IV.5

Exemple de substrate specifice pentru dehidrogenaze piridin-dependente

Tipul de enzime	Substrate	Tipul de enzime	Substrate
NAD-dependente	Izocitrat	NADP-dependente	Izocitrat
	D-β-Hidroxibutirat		D-Glucozo-6-fosfat
	D-Gliceraldehid-3-fosfat		
	Dihidrolipol		
	L-β-Hidroxiacil CoA	NAD- sau NADP-	
	Etanol	dependente	
	Lactat		L-Glutamat
	Glicerol-3-fosfat		
	L-Malat		

Majoritatea dehidrogenazelor au fost obtinute în stare cristalină, fiind dependente fie de NAD, fie de NADP; unele dintre ele pot reacționa în prezența ambelor coenzime (tabel nr. IV.5).



R = H (NAD^+) - Nicotinamid-adenin-dinucleotida

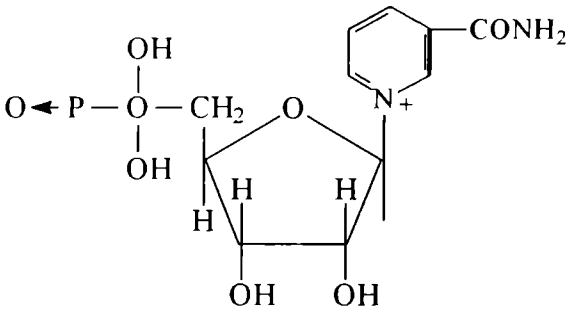
= PO_3H_2 ($NADP^+$) - Nicotinamid-adenin-dinucleotidfosfat

NAD şi NADP fac parte din categoria coenzimelor stoechiometrice, uşor difuzibile; fiind legate reversibil cu proteina (apoenzima), pot disocia uşor. Din acest punct de vedere, formele reduse şi oxidate ale NAD şi NADP pot fi privite mai curând ca substrate decât ca grupe prostetice.

Face excepție dehidrogenaza caracteristică gliceraldehid-3-fosfatului (din glicoliză), cu o capacitate mare de conservare a energiei, la care NAD este legată covalent de apoenzimă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

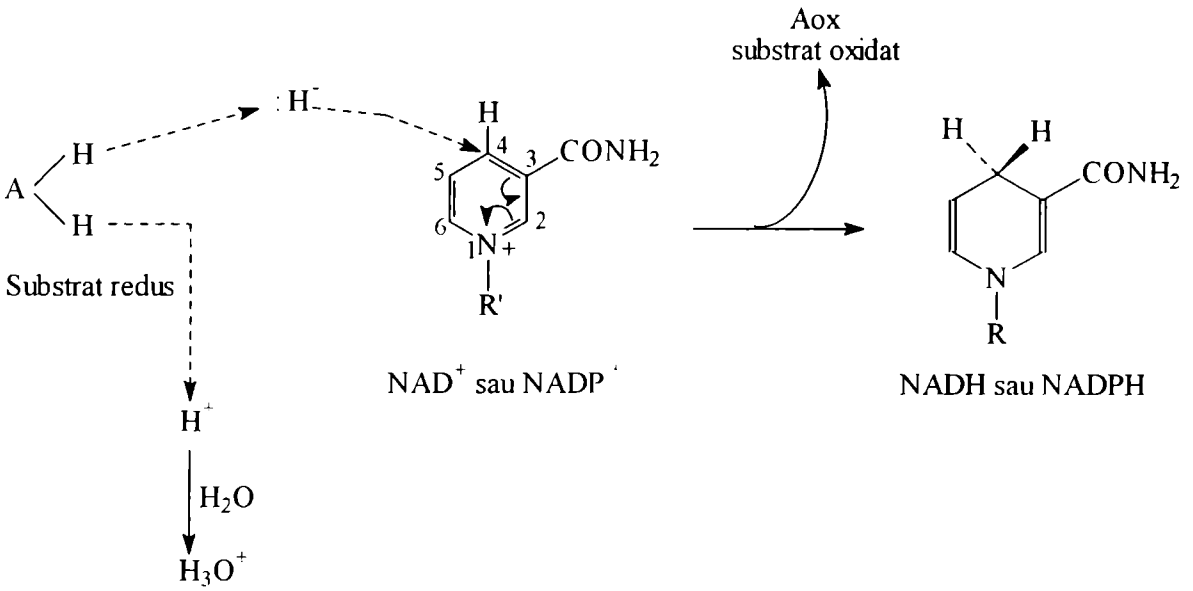
Tot din categoria nicotinamidcoenzimelor face parte şi nicotinamidmononucleotida (NMN), formată prin hidroliza parțială a NAD:



NMN$^+$ (nicotinamidmononucleotid)

NMN este un intermediar în biosinteza NAD şi NADP.

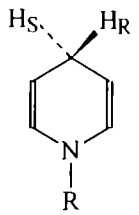
Formele oxidate NAD$^+$ şi NADP$^+$ joacă rol de acceptor de hidrogen de pe un substrat redus, pe care-l convertesc în produs de reacție ("substrat oxidat"). Transferul de hidrogen de la substrat are loc prin fixarea unui ion de hidrură în poziția 4 a inelului piridinic, protonul trecând în soluție, sub formă de ion de hidroniu:



Reacțiile sunt reversibile.

"Substrat redus" + NAD(P)$^+$ ⇌ "Substrat oxidat" + NAD(P)H

Stereospecificitatea deosebită a enzimelor NAD şi NADP-dependente se datorează faptului că cei doi atomi de hidrogen din ciclul piridinic al formelor reduse NADH şi NADPH sunt diastereotopici (nu pot fi interschimbați prin nici o operație de simetrie moleculară):



De aceea, enzimele transferă pe substrate fie H_R (pro-R) fie H_S (pro-S) din structura nicotin-amidică redusă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În celule sunt prezente atât NAD cât şi NADP (forme reduse şi oxidate). Diferența dintre NAD şi NADP este dată de raportul concentrațiilor formelor oxidate şi reduse :

$$\frac{[NAD^+]}{[NADH + H^+]} >> 1 \quad \text{şi} \quad \frac{[NADP^+]}{[NADPH + H^+]} << 1$$

Din această cauză, NAD^+ este utilizat pe căile catabolice, iar $NADPH + H^+$ este prezent în principalele căi anabolice.

În celulele ficatului, aproximativ 60% din NAD-ul total este prezent în mitocondrii şi restul – în citoplasma extramitocondrială. Din cantitatea totală de NADP, ceva mai mult se găseşte în citoplasma solubilă decât în mitocondrii.

Atât NADH cât şi NADPH prezintă o bandă de absorbție în UV la $\lambda = 340$ nm, care apare în formele reduse ca rezultat al modificării cromoforului piridinic şi care poate fi folosită la urmărirea mersului reacțiilor catalizate de enzimele NAD- şi NADP-dependente.

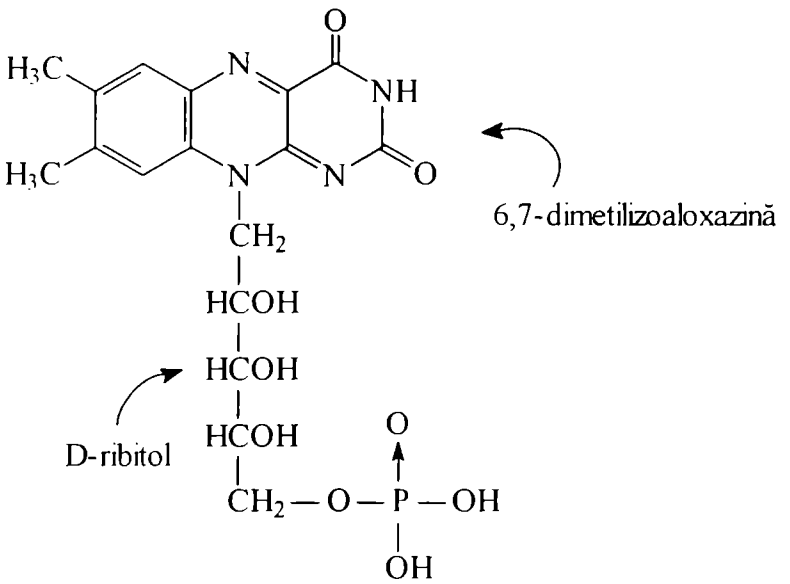
NAD^+ şi NADH intervin în: catabolismul aerob al glucozei, catabolizarea anaerobă a glucozei (glicoliza, fermentația alcoolică), în gluconeogeneza, în catabolismul lipidelor şi acizilor graşi, în biosinteza şi catabolismul hemului, în metabolismul acizilor nucleici etc.

$NADP^+$ şi NADPH intervin în: epimerizarea glucoză – fructoză din celulele seminale, în fotosinteză, în dezaminarea oxidativă a aminoacizilor etc.

B. Flavin- nucleotide

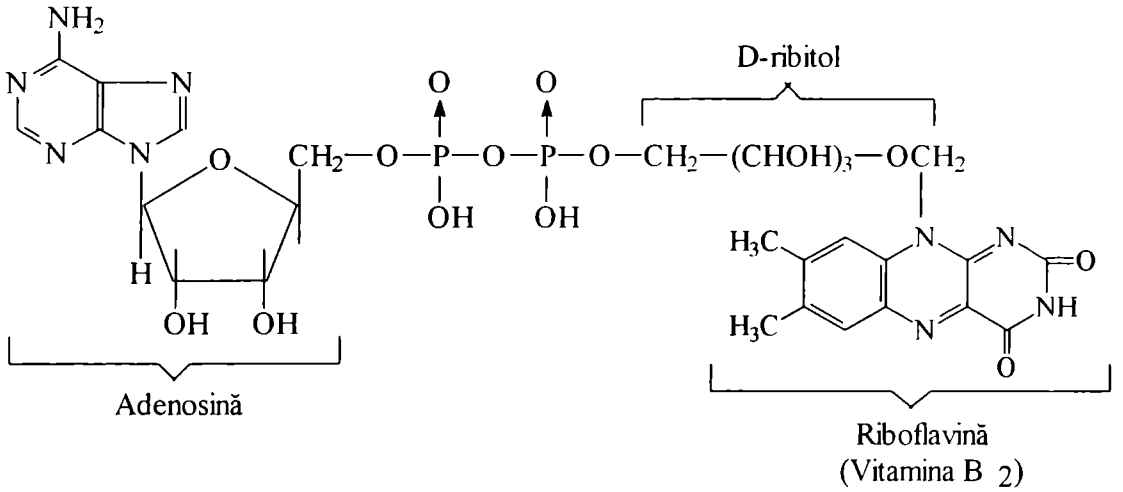
În dehidrogenazele flavin-dependente, flavin-nucleotidele sunt strâns legate de apoenzime de care nu se desprind în cursul ciclurilor catalitice. Flavin-coenzimele fac parte din categoria coenzimelor catalitice. Excepția face D-aminoacidoxidaza, care are o afinitate redusă pentru FAD (grupa sa prostetică).

Cele mai importante nucleotid-coenzime din această categorie sunt flavinadenin-mononucleotida (FMN) şi flavinadenindinucleotida (FAD):



FMN (Flavinadeninmononucleotida)

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

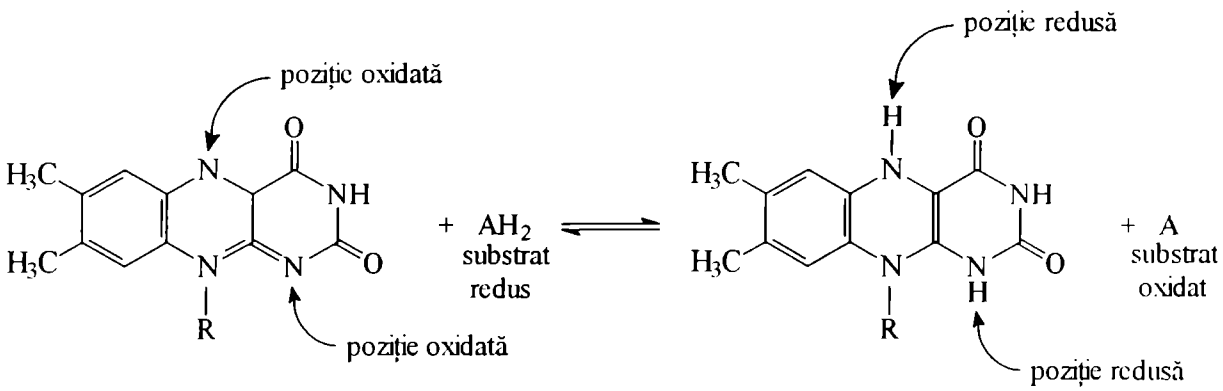


FAD (Flavinadenindinucleotida)

Din categoria flavin-dehidrogenazelor fac parte:

- NADHdehidrogenaza, care catalizează transferul de electroni de la NADH la diverşi acceptori (încă neidentificaţi total) din lanţul respirator (posibil proteine nelegate de hem);
- succinatdehidrogenaza implicată în ciclul lui Krebs al acidului citric;
- dihidrolipoildehidrogenaza din sistemele piruvat şi α-cetoglutarat-dehidrogenazele, implicate în ciclul acizilor tricarboxilici;
- flavoproteinele care catalizează dehidrogenarea primară din procesul de oxidare a acizilor graşi;
- xantinoxidaza;
- D-aminoacidoxidaza etc.

Porţiunea activă a FMN şi FAD, care participă la oxidoreduceri este reprezentată de ciclul izoaloxazinic din restul de riboflavină (vitamina B_2), care se poate reduce reversibil:



FMN sau FAD $\qquad$ $FMNH_2$ sau $FADH_2$

Structural, flavincoenzimele nu sunt nişte nucleotide adevărate, deoarece resturile de acid fosforic şi pirofosforic nu sunt fixate la D-riboză, ci la D-ribitol, la atomul C_5'. De aceea, ciclul izoaloxazinic nu este legat printr-un OH glicozidic, absent în cazul ribitolului.

Unele flavindehidrogenaze conţin mai mult de o moleculă de FMN sau FAD, iar altele conţin şi metale. NADdehidrogenaza conţine proteine nelegate de hem.

În general, oxidarea şi reducerea FMN şi FAD (în calitate de grupe prostetice ale enzimelor) includ simultan transferul a doi atomi de hidrogen şi a doi electroni.

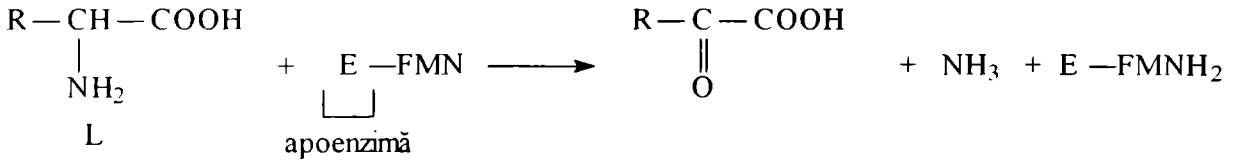
https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În formele lor oxidate, flavindehidrogenazele sunt intens colorate (roşii, brune, verzi), având două maxime de absorbție în spectrele electronice, la λ = 370 nm şi la λ = 450 nm. Formele reduse enzimatic sau chimic nu mai prezintă banda de la 450 nm, ceea ce foloseşte la monitorizarea reacțiilor catalizate de aceste enzime.

Procesele redox determină şi o variație a fluorescenței.

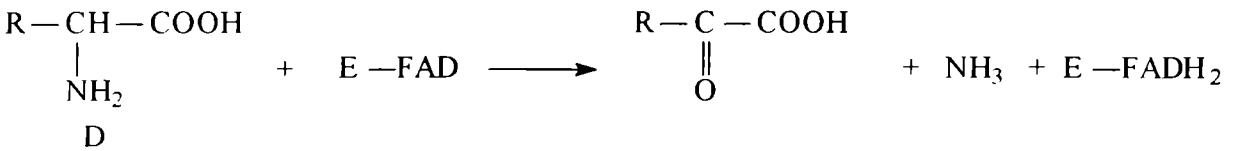
Formele reduse ale majorității flavindehidrogenazelor nu se reoxidează repede cu oxigen molecular, excepție făcând D-aminoacidoxidaza.

FMN participă în multe organisme la dezaminarea oxidativă, parte a metabolismului aminoacizilor. Astfel, L-aminoacidoxidaza are specificitate pentru L-aminoacizi:

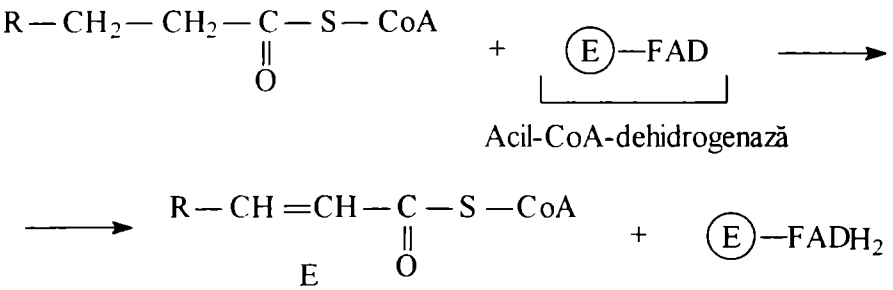


Această enzimă este prezentă în reticulul endoplasmatic din ficat, dar nu joacă un rol major în dezaminarea aminoacizilor în majoritatea celulelor animale, cu excepția lisinei.

D-aminoacidoxidaza este o FAD-enzimă, specifică pentru D-aminoacizi şi localizată în microcorpii ficatului:



FAD şi $FADH_2$ intervin în catabolizarea oxidativă a acizilor graşi activați sub formă de acil-CoA, ca şi în oxidarea acizilor ramificați.



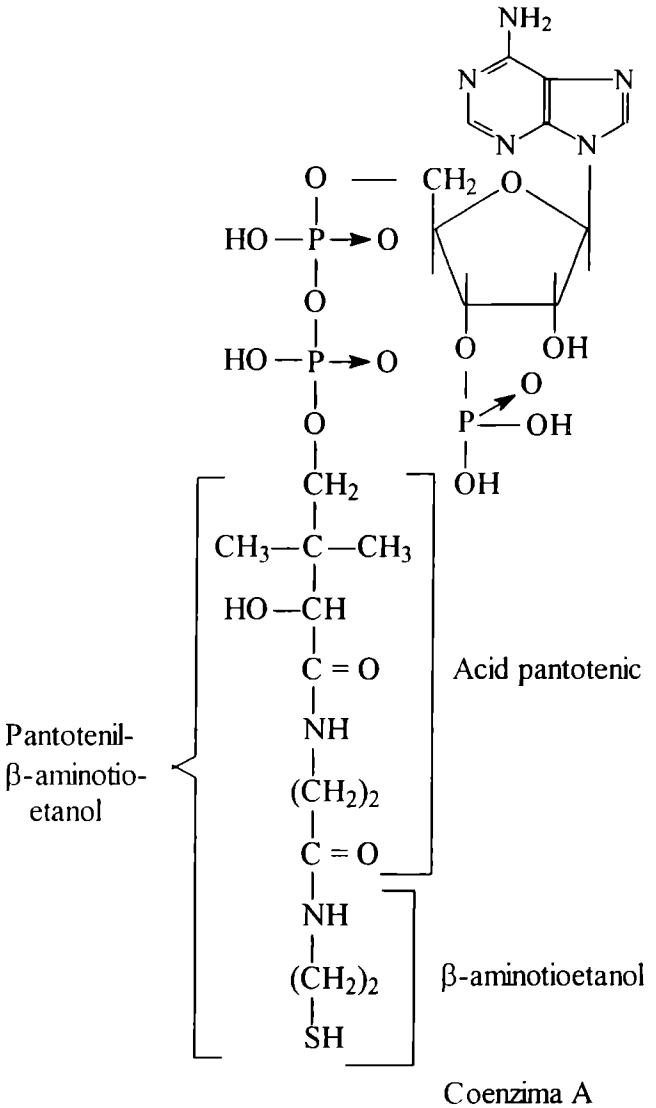
Există patru acil-CoA-dehidrogenaze care conțin FAD, fiecare specifică pentru o anumită lungime a lanțului acidului gras.

C. Coenzima A

Coenzima A (CoA sau CoA–SH) este o nucleotidcoenzimă derivată de la acidul pantotenic (component al grupului vitaminelor B).

Structural, CoA conține adenină legată β-glicozidic la C_1· al D-ribozei, iar la C_5· al D-ribozei este legat un rest de acid pirofosforic esterificat cu peptida pantotenil-β-aminotioetanol. În plus, molecula CoA conține şi un rest fosfat, legat la C_3' din D-riboză.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro



Funcția coenzimei A acetilate, ca purtatoare de grupe acil, este analoagă celei a ATP (purtător de grupe fosfat).

Acetilarea coenzimei A are loc prin tioesterificarea grupei –SH din molecula sa cu acid acetic:

$$CoA-SH + CH_3COOH \longrightarrow CoA-S-COCH_3 + H_2O$$

Coenzima A acetilată (acetil CoA)

Legătura tioesterică formată este macroergică, bogată în energie. Acetil-CoA reprezintă substanța cheie în metabolismul animal, având rolul de transportor de grupe acetil pe diverse substrate.

Această coenzimă intervine în penetrarea mitocondriilor de către acizii grași din citoplasma extramitocondrială în spațiul intramitocondrial, prin activarea lor sub formă de CoA-acilată.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.2. Acizii deoxiribonucleici (ADN)

Acizii deoxiribonucleici sunt polimeri ai deoxiribonucleotidelor, cu structură macromoleculară. ADN au fost puşi în evidenţă pentru prima oară în 1869, de către Friedrich Miescher. Au urmat studii intense şi aprofundate, soldate cu descoperiri esenţiale ca: structura ADN (1953), codul genetic (1966), mecanismul biosintezei proteinelor (după 1970), sinteza unor gene (1977) etc.

Între acizii nucleici (ca polinucleotide) şi proteine există unele analogii structurale, ambele tipuri de biomolecule fiind polimeri ai unor unităţi constitutive (nucleotide şi, respectiv, aminoacizi). Asemănarea avantajează transferul informaţiei genetice între aceste două clase. Proteinele sunt astfel atât rezultatul cât şi efectorii acţiunii genelor, incorporând la rândul lor informaţie genetică.

De aceea, acizii nucleici şi proteinele se încadrează în categoria biomoleculelor informaţionale. Macromoleculele biologice de ADN constituie informaţia genetică a tuturor organismelor, formând genomul (patrimoniul genetic al unui organism).

Genomul reprezintă totalitatea informaţiilor vitale din care, o parte, formată din caractere dominante, poate să se exprime în fenotip (totalitatea caracterelor anatomice, morfologice, etologice tipice unei fiinţe vii).

Organismele procariote, ale căror celule sunt lipsite de un nucleu individualizat (virusuri, bacterii) au un genom constituit din ADN. Dintre virusuri, există însă unele (HIV, virusul mozaicului tutunului) cu un genom format din acid ribonucleic (ARN).

În celulele eucariote, cu nucleu veritabil, genomul este constituit întotdeauna din ADN, el putând fi haploid (n cromozomi), diploid (2n cromozomi) sau poliploid (număr multiplu de cromozomi).

Cromozomii sunt bastonaşe colorabile din nucleul celular, al căror component principal, ADN-ul, conţine sub formă codificată, informaţia ereditară.

ADN există în unul sau mai mulţi cromozomi. Cu cât un organism conţine mai mult ADN, cu atât potenţialul său genetic este mai mare.

În fine, anumite organite celulare (mitocondrii, cloroplaste) au propriul lor genom.

Studiind structura ADN se poate înţelege mai bine rolul lor biologic, de o importanţă capitală pentru organismele vii.

Acizii deoxiribonucleici sunt molecule enorme, masa lor moleculară a fost determinată prin metode fizice: micrografie electronică, metode hidrodinamice, autoradiografie, micrografie cu raze X.

Numărul de perechi de nucleobaze ca şi lungimea totală a conturului molecular depind de natura organismului din care au fost izolaţi (A. Kornberg şi Freeman, 1980).

În tabelul nr. IV.6 sunt date câteva exemple ilustrative.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul nr. IV.6

Dimensiuni ale unor molecule de ADN

Organism	Număr de perechi de baze azotate (kb)*	Lungimea conturului (μm)
	Viruşi	
Polioma, SVHO	5,1	1,7
Bacteriofag λ	48,6	17
Bacteriofagi T_2, T_4, T_6	166	55
	Bacterii	
Microplasma hominis	760	260
Escherichia coli	4.000	1.360
	Eucariote	
Drojdie (în 17 cromozomi haploizi)	13.500	4.600
Drosophila (în 4 cromozomi haploizi)	165.000	56.000
Om (în 23 cromozomi haploizi)	2.900.000	990.000
Plămân de peşte (în 19 cromozomi haploizi)	102.000.000	34.700.000

* 1kb = 1 kilopereche de baze = 1000 perechi de baze

Moleculele ADN au mase moleculare definite, dar în majoritatea celulelor, acestea sunt atât de mari, încât acizii nucleici respectivi nu s-au putut izola uşor într-o formă intactă.

În procariote, care contin un singor cromozom, aproape tot ADN-ul este prezent sub forma unei singure macromolecule, cu masa de peste $2 \cdot 10^9$.

În bacterii, moleculele unice de ADN (care reprezintă mai mult de 1% din greutatea celulei) se găsesc în zona nucleară; dacă ADN este ataşat în interiorul membranei celulare, formează un mesosom, ADN nefiind aparent legat de proteine.

Unele molecule de ADN extracromozomial se găsesc în citoplasma bacteriană; aceste molecule, cu dimensiuni mult mai mici decât cromozomii, formează plasmide sau episomi, existând o relaţie genetică între aceştia şi ADN cromozomial.

În eucariote diploide, aproape tot ADN este prezent în nucleul celular, fiind combinat cu proteine bazice (histone) şi conţinut în cromozomi. Celulele eucariote conţin şi cantităţi foarte mari de ADN citoplasmatic, denumit ADN satelit, care diferă de ADN nuclear prin masa moleculară şi compoziţia nucleobazelor. Un tip de ADN satelit este prezent şi în mitocondrii, care conţin ~ 0,1-0,2% din ADN-ul celular total.

Unele plastide din celulele plantelor, în particular cloroplastele, conţin şi cantităţi mici dintr-un tip distinct de ADN.

Structura acizilor deoxiribonucleici este organizată pe patru nivele de complexitate:

- structura primară;
- structura secundară;
- structura terţiară;
- structura cuaternară.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.2.1. Structura primară a ADN

Macromoleculele de ADN se formează prin polimerizarea deoxiribonucleotidelor specifice (dAMP, dGMP, dCMP şi dTMP), moleculele acestora legându-se între ele prin legături fosfodiesterice.

Prin structura primară a ADN se înţelege secvenţa (ordinea) din lanţul polimer al deoxiribonucleotidelor caracteristice, care conţin ca nucleobaze: adenina (A), guanina (G), timina (T), citozina (C) şi uneori, baze metilate. Fiecare dintre resturile de nucleotide se uneşte de cea vecină prin legături de tip covalent, 3',5'-fosfodiesterice.

Unităţile constitutive (nucleotidele) ale edificiului molecular nu apar într-o ordine întâmplătoare, secvenţa şi proporţia bazelor purinice şi pirimidinice din nucleotide, corespunzând unei anumite structuri primare.

În fig. IV.2 este reprezentat un fragment din structura primară a ADN.

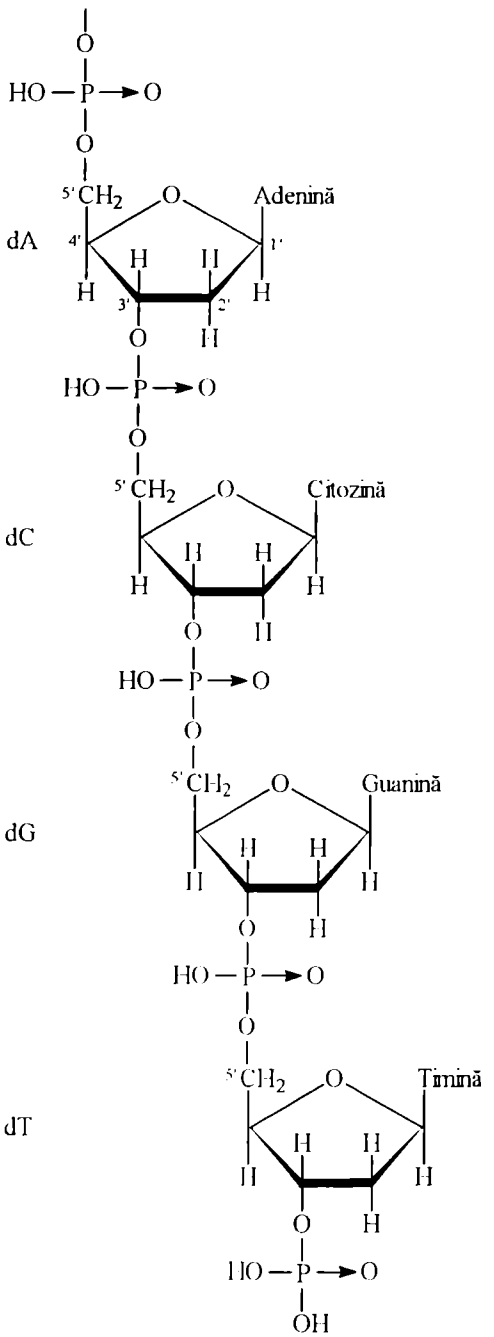


Fig. IV.2 Fragment dintr-o catenă ADN

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Se observă ca deoximononucleotidele componente ale ADN sunt legate între ele prin câte un rest de fosfat care esterifică deoxiriboza la grupa OH de la atomul $C_{5'}$ al unei nucleotide şi concomitent, la atomul $C_{3'}$ al deoxiribozei nucleotidei vecine. Dovada acestui tip de legătură s-a făcut prin inserarea unor deoxiribonucleotid-5'-fosfaţi marcaţi radioactiv, în molecula ADN.

La pH fiziologic, grupele OH libere din resturile de fosfat sunt ionizate, ceea ce explică faptul că ADN este de fapt un compus polianionic.

Modul de legare a nucleotidelor a fost determinat (ca şi în cazul ARN) şi prin hidroliză enzimatică, utilizându-se exo- şi endonucleaze specifice, pentru scindarea legăturilor 5' şi/sau 3' din catena ADN. Extremităţile 3' şi 5' ale catenelor polinucleotidice au o anumită polaritate, grupele fosfat fiind în acest caz monoesterificate.

Conform unei convenţii, secvenţa fragmentelor de ADN din fig. IV.2 se scrie începând de la capătul 5' către capătul 3' al lanţului. În transcrierea abreviată a unor secvenţe monocatenare se notează grupa fosfat cu p şi nucleobazele prin abrevierile specifice (A, T, G, C), precizându-se şi modul de legare la $C_{5'}$ şi $C_{3'}$ (care defineşte "polaritatea" lanţului).

Astfel, secvenţa din fig. IV.2 se poate transcrie:

pdApdCpdGpdT

Secvenţa monodeoxiribonucleotidelor din lanţul ADN defineşte codificarea informaţiei genetice. Mărimea enormă a acestui lanţ permite înmagazinarea unei cantităţi imense de informaţie.

Deoarece bazele azotate conţinute în ADN prezintă tautomerie amino-iminică şi lactam-lactimică, această tautomerie este de o importanţă deosebită în relaţia dintre structura primară a ADN şi activitatea sa biologică. Ea explică apariţia unor modificări spontane sau induse experimental în molecula ADN şi apariţia în consecinţă a unor structuri bioincompatibile (mutageneză, carcinogeneză).

Variaţii importante în compoziţia ADN-ului izolat din diferite specii vegetale şi animale au fost puse în legătură cu analiza cantitativă a deoxiribonucleotidelor formate prin scindarea hidrolitică a moleculelor de ADN (Chargaff, 1950).

S-a arătat astfel că în cadrul aceleiaşi specii, compoziţia ADN din diverse ţesuturi şi organe este foarte apropiată, indiferent de vârstă şi de factorii ecologici.

S-a constatat de asemenea şi existenţa unor regularităţi între proporţiile molare ale A, G, C, T, regularităţi care sunt cunoscute sub denumirea de "regulile Chargaff" şi anume:

a) suma bazelor purinice este egală cu a bazelor pirimidinice (A + G = C + T);

b) suma bazelor aminate (A + C) este egală cu cea a nucleobazelor hidroxilate (G + T);

c) existenţa unui raport cvasiunitar în cazul: $A+G/C+T \approx 1$ (tabel nr. IV.7).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabel nr. IV.7

Raporturi molare ale nucleobazelor din diverse varietăți de ADN

Specificare		A/T	G/C	A+G/C+T
Virusuri	Adenovirusuri	0,96	1,02	0,99
Bacterii	*Escherichia coli*	1,00	0,98	0,99
	Bacillus subtilis	1,01	0,98	1,00
Plante	Arahide	1,00	0,98	0,99
Animale	Broască	1,00	0,99	0,99
	Embrion de găină	1,10	1,12	1,11
Om	Ficat	1,00	0,98	0,99

În general, s-a observat că la eucariote, cuantumul de ADN din genom este mai mare decât la procariote (Sober, 1970; Kaplan şi Delpech, 1986).

În prezent, ADN din diferite specii se caracterizează mai ales prin raportul A+T/G+C, care este supraunitar la plante şi animale (1,20 – 1,58), are valoarea 1 la *E. coli* şi valori cuprinse în intervalul 0,35 – 2,70 la diverse bacterii.

Referitor la suma bazelor G+C prezente în compoziția acizilor deoxiribonucleici, ea variază la diferite specii de bacterii în intervalul 25 – 75%, pe când la alte specii variațiile sunt mai mici; astfel, la mamifere, G+C = 39 – 46%.

Sumarizând, se pot accentua următoarele aspecte legate de structura primară a ADN:

A) Compoziția ADN în nucleobaze este o caracteristică a fiecărui organism, toate celulele sale somatice, indiferent de vârstă şi de stare fiziologică, având un ADN cu acelaşi conținut în baze organice azotate.

B) Compoziția ADN în nucleobaze diferă de la o specie la alta în ambele regnuri vii; ADN se caracterizează deci prin specio-specificitate.

Analiza secvențială (determinarea secvenței nucleobazelor din lanțul macromolecular al ADN) a fost completată în laboratoarele de Biologie moleculară de sinteza dirijată (In care secvențele nucleotidice sunt înlănțuite dirijat).

ADN natural monocatenar se întâlneşte foarte rar. Astfel, el a fost depistat de Sinsheimer în 1959, la bacteriofagul ΦX 174; s-a observat că această catenă formează baze Schiff cu formaldehida, ceea ce arată că grupele $-NH_2$ ale nucleobazelor sunt libere, neîmperecheate prin legături de hidrogen. După Sinsheimer, ADN monocatenar coexistă în două forme: liniară (biologic inactivă) şi circulară (biologic activă).

IV.2.2. Structura secundară a ADN

Structura secundară a acizilor deoxiribonucleici este o conformație spațială, tridimensională.

Elaborarea modelului propus în 1953 de către J. Watson şi F. Crick pentru structura fibrelor de ADN a marcat momentul naşterii biologiei moleculare moderne. Structura Watson – Crick este deosebit de importantă în definirea ADN ca moleculă centrală a vieții, un pas hotărâtor în descifrarea mecanismului molecular al eredității.

Informații asupra structurii secundare a ADN dublu-helicoidal au fost furnizate de difracția cu raze X a unei fibre de ADN (R. Franklin). Cristalografia cu raze X a arătat că:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

- ADN este o moleculă helicoidală;

- nucleobazele sale, cu structură plană, sunt stivuite în spațiu în așa fel încât ciclurile lor să fie paralele între ele și cu axa fibrei.

Aceste prime observații au stat la baza modelului Watson – Crick, confirmat în mare de investigațiile care i-au urmat. Ulterior, s-a realizat că dublul helix al ADN poate adopta câteva structuri distincte în funcție de factori ca: umiditate, prezența unor cationi și nu în ultimul rând, de secvența nucleobazelor.

Modelul clasic Watson – Crick se referă la forma de ADN-B, varietatea cea mai frecventă.

După Watson și Crick, dublul helix al ADN este constituit din două catene spiralate, cu pasul pe dreapta, aranjate în sens opus ("polaritate inversă"): legături orientate 3`-5' la un capăt și respectiv 5'-3' la călălalt capăt al catenei (fig. IV.3).

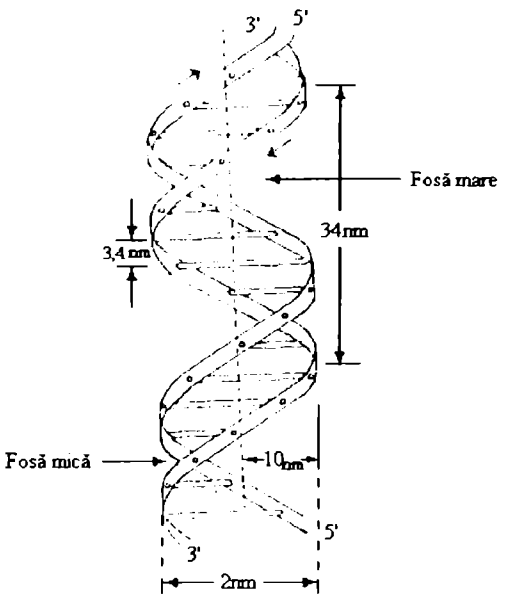


Fig. IV.3 Reprezentare simplificată a modelului Watson – Crick pentru ADN-B

Dublul helix este torsionat în jurul unei axe centrale (axa helicală); catenele astfel răsucite vor forma două șanțuri (fose, incizuri): șanțul mic (fosa mică) și șanțul mare (fosa mare).

Diferite specii chimice care interacționează cu ADN (hormoni, antibiotice, enzime, ioni metalici etc.) se plasează pe una sau pe alta dintre fose (incizuri).

Diametrul unei spire complete este de 2nm. Fiecare spiră completă a unei elice are înălțimea de 3,4nm și este formată din 10 perechi de nucleobaze complementare de pe cele două lanțuri helicoidale, legate prin legături de hidrogen. Elicea este răsucită cu 36° față de fiecare pereche. Distanțele dintre două baze vicinale, de pe aceeași elice sunt de 0,34nm.

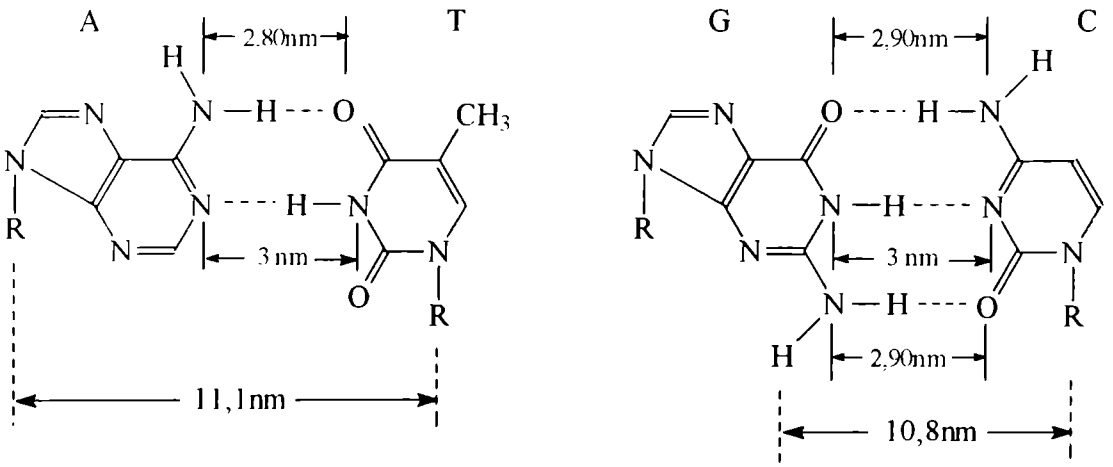
Între nucleobazele vecine intervin legături hidrofobe care se stabilesc între nucleele lor heterociclice, prin stivuire.

Diametrul dublului helix este de 2nm. Ne putem imagina structura secundară a ADN-B ca pe o "scară" torsionată ale cărei bare verticale sunt formate din resturile de deoxiriboză și acid fosforic și ale cărei trepte se constituie din perechi de baze azotate legate complementar prin legături de hidrogen.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Bazele azotate din structura fiecărei catene polinucleotidice, stivuite una peste alta, sunt plasate spre interiorul aranjamentului bicatenar, dublu-helicoidal. Stabilitatea edificiului astfel format este asigurată de lagăturile de hidrogen care iau naştere între nucleobazele catenelor complementare; aceste legături sunt perpendiculare pe axa centrală a dublului helix. Aceste legături (care asigură coeziunea celor două catene complementare) se formează numai între bazele purinice de pe o catenă şi cele pirimidinice de pe catena complementară, sub formă de perechi: A – T, T – A, G-C, C-G. Complementaritatea catenelor polinucleotidice trebuie deci privită ca o complementaritate secvențială, cu orientare antiparalelă reciprocă a nucleotidelor din structura lor.

Între adenină şi timină se pot forma două legături de hidrogen (A⁝⁝T) iar între guanină şi citosină, trei asemenea legături (G⁝⁝⁝C)



Modelul va avea întotdeauna acelaşi număr de baze adeninice şi timinice şi acelaşi număr de baze guanosinice şi citosinice.

Legarea unor perechi de baze numai purinice sau numai piridimice este exclusă, întrucât în primul caz, spațiul din molecula ADN bicatenar este insuficient pentru a le insera, iar în al doilea caz, distantele dintre baze depăşesc limitele impuse de stabilirea unor legături de hidrogen. Secvența bazelor de-a lungul lanțului polinucleotidic este restrictivă, ea transferând informația genetică.

Acest model de ADN-B conceput de Watson şi Crick presupune formarea unui număr maxim de legături de hidrogen între perechile de baze azotate complementare, ca principalele forțe care asigură o maximă stabilitate edificiului molecular. Alături de acestea, mai contribuie la stabilizarea aranjamentului şi interacțiile hidrofobe care iau naştere în mediu apos între părțile nepolare (nucleele heterociclice) ale bazelor azotate vicinale, de pe aceiaşi catenă (panglică) polinucleotidică, stivuite (împăturite) ordonat în interiorul dublului helix şi ale căror forțe sunt orientate paralel cu direcția axului acestuia.

Specificitatea moleculelor de ADN față de diferiți compuşi chimici sau constituenți celulari este asigurată de existența celor două tipuri de fose (şanțuri), fenomen pus în evidență de Wilkins şi colab.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.2.3. Structura terțiară a ADN

Prin structura terțiară se înțelege modul de dispunere spațială a dublului helix al ADN, care se aranjează în cromozomii procariotelor şi eucariotelor. De fapt, atât structura terțiară cât şi cea cuaternară apar datorită formării unor complexe supramoleculare între acizii nucleici şi proteine.

Mediul apos al celulelei conferă ADN flexibilitate (cu posibilitatea de a adopta o varietate de aranjamente), dar şi posibilitatea plierii lanțurilor polinucleotidice. Prin pliere, moleculele ADN adoptă forme compacte şi dimensiuni reduse, în conformitate cu necesitatea acomodării lor cu dimensiunile formațiunilor nucleare din celule. Astfel, la procariote se întâlneşte o singură moleculă bicatenară de ADN, liniară sau circulară. Molecula ADN are un aspect plat, nu este legată de proteine şi constituie aşa-numitul genofar. Celulele procariote, care nu au înveliş perinuclear, conțin un singur cromozom, format dintr-o singură moleculă de ADN, dispusă în zona nucleară. Macromolecula ADN are lungimea de ~1,2nm, fiind strâns spiralată.

În cazul eucariotelor, ADN adoptă o formă mai complexă de organizare (încă neelucidată total), aflându-se în proporție de 95% în cromozomii din nucleul celular, prevăzut cu înveliş perinuclear. La aceste celule, ADN se asociază cu proteine bazice (histone), formând "aparatul genetic celular". Se pare că un cromozom conține mai multe macromolecule de ADN.

ADN nuclear are o structură heterogenă: secvențe deoxiribnucleotidice scurte repetate de foarte multe ori, care constituie ADN-ul reiterativ (~30 – 40%) şi secvențe unice, de ADN nereiterativ (~60 – 70%), aşa după cum a arătat Sissoeff, în 1976.

Pentru ca ADN să se poată adapta steric spațiului delimitat de învelişul perinuclear, este necesară o compactare avansată a sa, ca expresie a structurii terțiare şi cuaternare. Sistemul de compactare trebuie să permită ca ADN să rămână accesibil proteinelor care reglează extensia şi replicarea sa. De aceea, compactarea va prezenta două nivele structurale:

- nucleosomul, care reprezintă structura terțiară fundamentală caracteristică eucariotelor şi
- cromatina, o suprastructură variabilă, în funcție de natura celulelor şi de cinetica lor. Cromatina reprezintă de fapt stuctura cuaternară a ADN, participând la formarea cromozomilor.

Nucleosomul, obținut prin degradarea enzimatică sau prin ultrasonicarea cromatinei, a fost investigat după 1970 prin micrografie electronică de înaltă rezoluție, difracție cu raze X, difracție cu neutroni etc. Nucleosomul are o formă sferică, cu un diametru de ~7nm, fiind format din molecule de ADN bicatenar cu lungimea de ~40nm şi masa de 8kDa, rulat suprahelical. În nucleosomi, catenele de ADN sunt rulate în jurul unor proteine bazice, cu masa moleculară medie de ~12kDa (histone), după cum se poate observa în fig. IV.4.

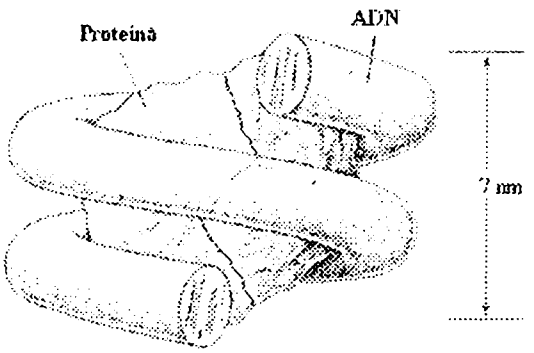


Fig. IV.4 Structura unui necleosom

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Histonele din cromatină, componente ale nucleosomilor, reprezintă uneori mai mult de jumătate din masa cromatinei. Aceste proteine aparţin de patru subclase (H1, H2A, H2B, H3 şi H4), fiecare dintre ele conţinând în catena polipeptidică resturi de aminoacizi bazici, cu sarcini pozitive (Arg şi Lys), după cum se poate observa din tabelul nr. IV.8.

Tabelul nr. IV.8

Histone din timusul de vițel

Histona	Număr de aminoacizi	Masa (kDa)	% Arg	% Lys
H1	215	23,0	1	29
H2A	129	14,0	9	11
H2B	125	13,8	6	16
H3	135	15,3	13	10
H4	102	11,3	14	11

Aceste histone, cu caracter bazic, formează legături ionice cu grupele fosfat electronegative din ADN, conducând la nucleosomi. Histonele se pot extrage din cromatină cu NaCl 0,5M care desface aceste legături electrostatice.

Secvenţele de aminoacizi din histonele H2A, H2B, H3 şi H4 au o remarcabil de înaltă stabilitate evolutivă. De exemplu, histonele H4 din bovine şi mazăre, despărţite între ele printr-un interval evolutiv de 1,3 miliarde ani, diferă doar prin structura a două fragmente de aminoacizi. Înseamnă că, prin structura lor, histonele sunt intolerante la schimbări.

În schimb, histona H1 are o variabilitate mai mare decât celelalte, ceea ce înseamnă că rolul său este diferit.

După cum au arătat însă L. Cohen, K. Newrock şi A. Zweidler, majoritatea, dacă nu toate eucariotele conţin subtipuri distincte genetic de histone H1, H2A, H2B şi H3, a căror sinteză a avut loc fie în cursul stadiilor specifice ale embriogenezei, fie în cursul dezvoltării celulare.

În embrionii de pui s-a pus în evidenţă şi histona H5, rolul şi natura sa fiind neelucidate.

În urma studiilor efectuate asupra structurii cromatinei (R. Kornberg, 1974), s-a postulat că histona H1 este asociată cu ADN pe suprafaţa nucleosomului în modul indicat în fig. IV.5.

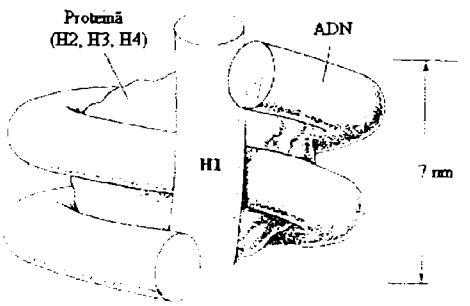


Fig. IV.5 Modul de legare a histonei H1 în nucleosomi

Pe baza unor studii fizico-chimice, în special dicroismul circular (Houssier, 1977; Gârban, 1982) s-au determinat parametrii geometrici ai ADN din nucleosomi: pasul şi diametrul (parametrii liniari), ca şi înclinaţia superhelixului (parametru angular), specificaţi în tabelul nr. IV.9.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tabelul nr. IV.9

Parametrii geometrici ai structurii terțiare a ADN din nucleosomi

Pasul (nm)	Diametrul (nm)	Înclinația
4,5	5,6	75°30'
12,0	10,0	89°00'
5,3	13,0	82°30'
4,5	7,4	79°00'

La eucariote, structura superhelicoidală (supermoleculară) a ADN are un rol important în diviziunea celulară. Această structură superhelicoidală se deosebeşte de structura secundară de tip ADN-B, la care măsurătorile au evidențiat inexistența unor unghiuri de înclinație.

IV.2.4. Structura cuaternară a ADN

Acest tip de structură, încă incomplet elucidată şi în strânsă legătură cu diverse faze citocinetice, este reprezentat în principal de cromatină.

Această denumire aparține lui Flemming (1879), care a definit-o ca fiind o substanță nucleară colorabilă cu coloranti bazici. Formele condensate ale cromatinei, observate în cursul mitozei, au fost denumite cromozomi (Flemming, 1889).

Studiul cromatinei a evidențiat faptul că ea reprezintă un ansamblu de asocieri supramoleculare de ADN nuclear, proteine şi ARN (Kaplan şi Delpech, 1990). Cromatina, component fundamental al cromozomilor din nucleele celulare, reprezintă nivelul cel mai evoluat al organizării ADN – structura cuaternară.

În 1974, R. Kornberg a pus în evidență mai multe aspecte ale sintezei cromatinei, care rezultă prin asamblarea nucleosomilor. În esență, rezultatele acestor cercetări au stabilit următoarele:

1) Cromatina contine în linii mari un număr egal de molecule de histone H2A, H2B, H3 şi H4 şi nu mai mult de jumătate din acest număr, molecule de histonă H1.

2) Difracția cu raze X arată că fibrele de cromatină au o structură regulată, care se repetă după ~10nm în direcția lungimii fibrei. Aceleaşi rezultate la difractia cu raze X s-au observat în cazul în care ADN purificat este amestecat cu cantități echimoleculare de histone, cu excepția histonei H1.

3) Micrografia electronică a cromatinei relevă faptul că este constituită din particule cu diametrul de ~10nm (nucleosomi), legate între ele cu fire subțiri de ADN, la fel ca perlele dintr-un colier. Aceste particule sunt responsabile de forma diagramelor obținute la difracția cu raze X.

4) Prin digestia cromatinei cu micrococcal nuclează (care desface ADN dublu catenar), se observă doar o rupere a firelor de ADN care leagă nucleosomii. S-a tras concluzia că în nucleosomi, moleculele dublu – catenare de ADN sunt protejate față de digestie.

5) Datele experimentale au arătat că histonele H3 şi H4 se asociază sub formă de dimeri: $(H3)_2(H4)_2$.

Toate aceste observații l-au determinat pe Komberg să emită ipoteza conform căreia fibrele de cromatină, formate din nucleosomi, sunt constituite din octamerul:

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

$(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$, în asociere cu aproape 200 fragmente de ADN, histona H1 fiind asociată în acelaşi mod, pe suprafaţa nucleosomului (fig. IV.5).

Cromozomii celulelor eucariote, constituiţi din cromatină, sunt entităţi dinamice, care aparent variază dramatic cu stadiul ciclului celular.

Numai cromozomii individuali acceptă forme condensate în cursul diviziunii celulare, o fază a ciclului celular. În interfaze (în restul ciclului celular), când ADN este transcris şi replicat, cromozomii majorităţii celulelor se dispersează atât de mult, încât pot fi distinşi individual prin microscopie electronică de înaltă rezoluţie.

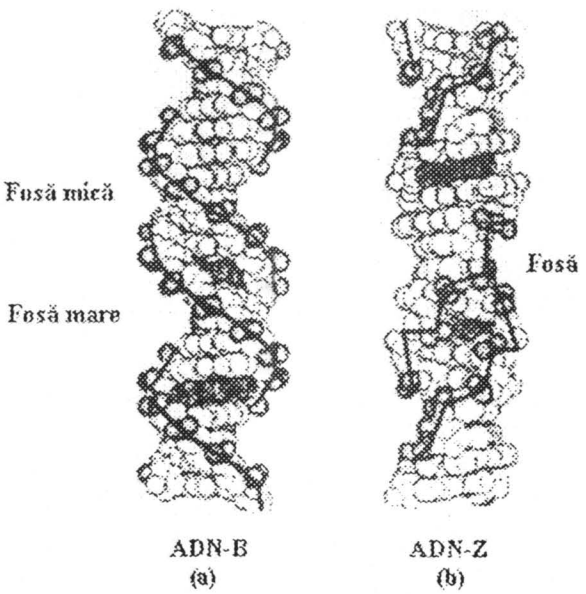
Citologii recunosc pe această bază două tipuri de cromatină dispersată, dintre care una prezintă o împachetare mai puţin densă, numită eucromatină şi cealaltă, cu un grad mai mare de împachetare, denumită heterocromatină. Între aceste două tipuri de cromatină există o deosebire esenţială: eucromatina este exprimată genetic, pe când heterocromatina nu este exprimată genetic.

Structura şi compoziţia cromatinei fac ca ADN cromozomial să aibă un grad ridicat de compactare; raportul de împachetare, exprimat prin împărţirea lungimii totale a conturului său la lungimea conţinutului, are valori de peste 8.000.

IV.2.5. Tipuri de ADN

ADN dublu helicoidal este o moleculă variabilă configuraţional şi conformaţional; din această cauză, în celulele vii, pe lângă forma structurală ADN-B (majoritară) se întâlnesc şi alte tipuri de acizi deoxiribonucleici.

În general, tipurile de ADN dublu catenar prezintă chiralitate helicoidală; există în esenţă două genuri de configuraţii ale acizilor deoxiribonucleici: cu dextrorotaţie şi cu senestrorotaţie (fig. IV.6).



a) ADN cu dextrorotaţie; b) ADN cu senestrorotaţie

Fig. IV.6 Configuraţii ale aranjamentului dublu catenar al ADN

Diferitele tipuri de ADN au fost caraterizate prin parametrii lor stereochimici şi angulari.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.2.5.1. ADN cu dextrorotație

Cele patru tipuri de ADN cu dextrorotație (A, B, C și D) au fost denumite "genuri", "clase", "familii".

1° ADN-A (o formă adoptată și de ARN) este mai compact decât genul ADN-B. Acest gen de ADN are bazele înclinate cu un unghi de 20° în raport cu helixul, ceea ce duce la o modificare a translației, pasul helical fiind de 2,56nm și cuprinzând 11 baze/tură (tabel nr. IV.10).

ADN-A este deci un acid nucleic monocatenar. Un asemenea gen de ADN a fost extras de R. Sinsheimer în 1959 dintr-un virus mic (Φx174), care atacă bacteria *Escheridia coli* (bacteriofag). Datele fizico-chimice au evidențiat structura monocatenară a acestui gen de ADN, care s-a dovedit a fi parțial ciclic (circular) și parțial liniar.

ADN-A ciclic este o moleculă închisă, monocatenară, care se recunoaște prin următoarele caracteristici:

a) nu este atacat de exonucleaze, care sunt specifice capetelor moleculelor de ADN dublu-catenar;

b) reacționează cu formaldehida, formând baze Schiff cu grupele amino libere ale nucleobazelor neangajate în legături de hidrogen (ca în cazul ADN dublu-helicoidal);

c) nu există o echivalență cantitativă între A și T și G și C, caracteristică moleculelor bicatenare;

d) prin microscopie electronică s-a pus în evidență existența unui filament continuu de ADN.

ADN monocatenar ciclic poate fi desfăcut cu ajutorul unei endonucleaze specifice, fiind transformat în ADN aciclic (fig. IV.7).

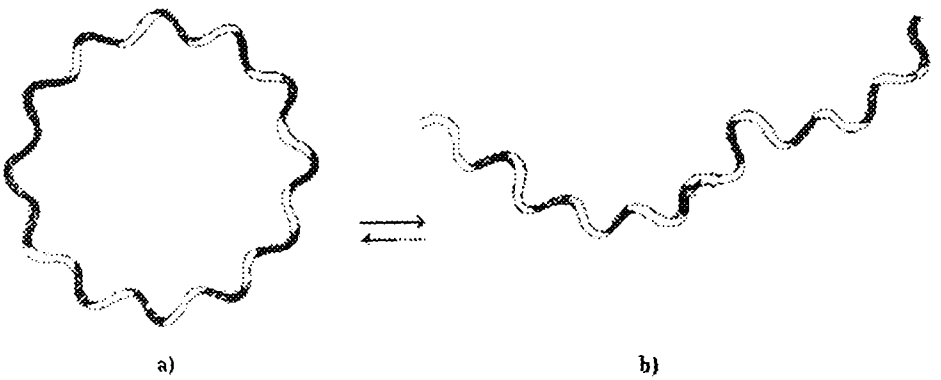


Fig. IV.7 Forme ale genului ADN-A (monocatenar)
a) ciclic; b) aciclic

La centrifugare, forma circulară (mai compactă) are o viteză de sedimentare mai mare decât forma aciclică, de care se poate astfel separa. Cele două forme se deosebesc și prin acțiunea lor biologică diferită: ADN circular din virusul Φx174 produce infecția bacteriei la fel ca virusul întreg, iar forma aciclică este inactivă. Acest lucru este în sprijinul ipotezei conform căreia, în virus, ADN monocatenar se găsește sub formă ciclică, forma aciclică rezultând prin scindarea acesteia.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Genul ADN-A poate apărea şi în urma scindării ADN-B (bicatenar) in vitro, sub acţiunea a mai multor factori externi:

- dacă umiditatea relativă a mediului se reduce la 75%, ADN-B îşi schimbă reversibil conformaţia, trecând în genul ADN-A;

- sub acţiunea cationilor metalici sau a solvenţilor organici care scindează legăturile de hidrogen dintre nucleobazele perechi situate pe cele două panglici complementare ale dublului helix.

Observaţiile experimentale in vitro au arătat că unele segmente normale de ADN-B îşi pot asuma conformaţia de ADN-A în condiţiile amintite.

In vivo, ADN-A se formează sub acţiunea proteinelor bazice. Şi prezenţa purinelor din lanţurile helicale este importantă. Astfel, dacă în dublul helix sunt suprapuse perechi de baze purinice vecine de tip G/G, macromolecula va evolua, într-un mediu slab polar, către genul ADN-A.

2° ADN-B corespunde modelului clasic Watson – Crick, fiind considerat forma nativă a ADN şi fiind majoritar în celulă.

Dublul helix se poate desface şi reasocia cu uşurinţă, ceea ce este foarte important în procesul replicării şi transcripţiei. Desfacerea dublului helix sub influenţa unor agenţi chimici sau a temperaturii poartă numele de denaturare.

Astfel, în prezenţa acizilor şi bazelor (care pot ioniza nucleobazele din ADN bicatenar), ca şi sub influenţa temperaturii, legăturile de hidrogen care asigură stabilitatea dublului helix se rup; în cazul denaturării termice, procesul se numeşte topire. T_m (temperatura de topire) este temperatura la care jumătate din structura dublu-helicoidală este desfăcută.

Denaturarea este acompaniată de schimbări calitative importante ale proprietăţilor fizice, ca diminuarea drastică a viscozităţii înalte a soluţiilor de ADN, care asigură rezistenţa la deformare a duplexului molecular.

Stabilitatea dublului helix al moleculei de ADN şi valorile T_m caracteristice depind de mai mulţi factori: natura soventului, pH-ul mediului, natura şi concentraţia ionilor din soluţie. Astfel, T_m creşte liniar cu fracţia molară a perechii G-C, deoarece legăturile triple de hidrogen stabilite între guanină şi citosină sunt mai stabile decât legăturile duble de hidrogen dintre adenină şi timină.

Procesul denaturării poate fi evidenţiat şi controlat cu ajutorul spectrelor electronice de absorbţie (U.V.) ale ADN. ADN absoarbe specific la λ=260 nm, datorită prezenţei ciclurilor heteroaromatice ale nucleobazelor. Denaturarea conduce la o creştere a intensităţii absorbţiei (efect hipercronic), ca rezultat al dispariţiei legăturilor de hidrogen dintre bazele azotate care stabilizează dublul helix.

Procesul invers al renaturării sau călirii (reasocierea), care implică refacerea acestor legături (şi deci a dublului helix), are ca rezultat efectul hipocrom, de scădere a intensităţii absorbţiei de la 260 nm. Reasocierea este strict dependentă atât de temperatură (care trebuie să fie inferioară valorii T_m) dar şi de concentraţia moleculelor de ADN.

Astfel, dacă o soluţie de ADN denaturat se răceşte rapid sub T_m, ADN renaturat poate prezenta numai o împerechere parţială a nucleobazelor, deoarece nu există suficient timp pentru

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

a se reface toate legăturile de hidrogen dintre cele două panglici polinucleotidice, cu reconstituirea structurii inițiale.

3° ADN-C

Genul ADN-C a fost găsit in vitro la unele genomuri virale, ca și la tranziția genului ADN-B în condițiile creșterii concentrației de cationi din mediu.

Varietatea de ADN-C prezintă o structură secundară mai apropiată de genul B. Astfel, la genul ADN-C se observă o ușoară înclinare a bazelor (-6°) față de axul duplexului, ceea ce conduce și la modificarea altor parametri geometrici ca pasul helical, care devine 0,331 nm și include un număr de 9,3 perechi de nucleobaze.

În condițiile scăderii polarității mediului in vitro (adăugare de alcool la soluțiile apoase) și ale scăderii umidității relative a fibrelor de ADN în absența sărurilor (66% umiditate la genul C față de 92% umiditate la genul B), are loc tranziția ADN-B → ADN-C.

4° ADN-D este un gen mai puțin cunoscut; el se caracterizează printr-un unghi de rotație de 45° a nucleobazelor, cel mai mare în comparație cu celelalte genuri de ADN cu dextrorotație. Acest unghi influențează în principal pasul helicoidal, care devine de 0,33 nm.

Tranziția ADN-B → ADN-D este determinată de existența unor perechi vecine de baze purinice suprapuse (A/A).

Tabel nr. IV.10

Particularități structurale ale unor genuri ideale de ADN

Genul de ADN	A	B	Z
Sensul elicei	De dreapta	De dreapta	De stânga
Diametru	~ 2,6 nm	~ 2 nm	~ 1,8 nm
Perechi de baze/tură	11	10	12 (6 dimeri)
Unghi de răsucire helicală per pereche de baze	33°	36°	60° (per dimer)
Înclinația elicei (înălțimea turei)	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
Înălțimea helixului per pereche de baze	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
Înclinația bazei față de axul helixului	20°	6°	7°
Șanțul major	Îngust și adânc	Larg și adânc	Neted
Șanțul minor	Larg și puțin adânc	Adânc și strâmt	Strâmt și adânc

În principal, genurile de ADN cu dextrorotație sunt condiționate de:

- natura și poziția bazelor din lanțurile polinucleotidice;
- polaritatea mediului;
- interacții ionice;
- acțiunea unor agenți chimici care favorizează tranzițiile, ca: metale, agenți alchilanți, hormoni steroizi etc. (Gârban și al., 1983, 1985).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Metoda fizică de investigație cu ajutorul căreia se pun în evidență tranzițiile de la genul ADN-B (corespunzător stării native a moleculei) la celelalte genuri cu dextrorotație este reprezentată de spectrele de dicroism circular (Tunis-Schneider şi Maestre, 1970).

IV.2.5.2. ADN cu senestrorotație

ADN cu senestrorotație prezintă o torsionare spre stânga a dublului helix macromolecular. Modelul macromoleculei are grupele fosfodiesterice dispuse în zig-zag (fig. IV.6). Acest tip de ADN este cunoscut sub denumirea de ADN-Z (Rich, 1980).

Genul ADN-Z are 12 perechi de nucleobaze per tură (360°), prezentând parametri sterici specifici (tabel nr. IV.10). Înălțimea unei ture este 4,5nm şi, în contrast cu ADN-A, ADN-Z are un şanț minor strâmt şi adânc şi un şanț major nedistinctibil (neted).

În ADN-Z, perechile de nucleobaze sunt răsucite la 180° față de cele din ADN-B. În consecință, unitatea repetitivă din ADN-Z este o dinucleotidă (un dimer) şi nu o mononucleotidă, ca în genurile de ADN cu dextrorotație (A, B). Acest dimer este de tipul $(X_pY_p)_2$, în care: X = bază pirimidinică; Y = bază purinică; p = rest fosfat.

Din această cauză, resturile de fosfat sunt aranjate în jurul helixului.

Soluții foarte concentrate de săruri stabilizează genul ADN-Z comparativ cu ADN-B, reducând repulsiile electrostatice dintre grupele fosfat, prea apropiate pe cele două panglici complementare (la 0,8 nm în cazul ADN-Z față de 1,2 nm la ADN-B).

Genul Z, cu totul diferit de genurile ADN cu dextrorotație, are helixul mult mai elongat decât genul ADN-B şi mai subțire decât acesta.

Bazele din ADN-B se pot modifica după biosinteza sa. Cea mai obişnuită modificare este metilarea citosinelor, cu formare de metilcitosine. Prezența acestora în gene se corelează cu genele inactive transcripțional, în secvențele dubletelor alternante C-G, fiind favorizată tranziția ADN-B → ADN-Z.

Deoarece în ADN-Z dublul helix are un diametru mai mic decât ADN-B, acest fapt determină o distorsiune a dublului helix (Rich şi al., 1984; Popa şi Repanovici, 1991).

Studiul in vitro al tranziției ADN-B (bogat în nucleobaze C-G) sugerează posibilitatea separării catenelor în prezența $MgCl_2$, urmată de reîmperecherea bazelor şi orientarea lor cu formarea dublului helix al ADN-Z. S-a arătat de asemenea că tranzițiile de forma ADN-B → ADN-Z sunt compatibile cu mediul fiziologic.

Genul ADN-Z a fost pus în evidență la cromozomii din Drosophila, chironomide şi chiar la cromozomii umani. Astfel, metilarea citosinei in vivo face posibilă tranziția ADN-B → ADN-Z, provocându-se inactivarea unor gene.

Tranzițiile sunt activate sub acțiunea unor agenți de metilare sau a sperminei şi determină scăderea concentrației ionilor Mg^{2+}, necesară separării catenelor în etapa inițială a inactivării ADN-B. Stabilizarea ADN-Z nou format are loc prin legare cu proteine specifice, cu mase moleculare de 70-150 kDa.

S-a mai demonstrat că, pe același helix, este posibilă coexistența genului ADN-Z în regiunile bogate în perechi G-C şi a genului ADN-B în restul regiunilor. În regiunile cu structură de ADN-Z se pot fixa histone care determină represia nespecifică a activității biologice a segmentului respectiv.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Rich a postulat că, conversia reversibilă a unor segmente specifice din ADN-B în ADN-Z acționează (în circumstanțe specifice) ca un factor al reglării genetice.

Deosebirea dintre genurile de ADN este reflectată în rolul lor biologic. Astfel, în timp ce ADN-Z are acțiune de inhibare a activității genelor din cromozomi, tranziția la ADN-B implică trecerea genelor în stare activă.

Tranziția ADN-B → ADN-Z, perturbatoare a activității biologice a ADN nativ, conduce la apariția unor situsuri asupra cărora acționează factori fizici (radiații) sau chimici din mediu, cu acțiune mutagenă şi/sau oncogenă.

Efectele mutagene şi oncogene ar putea fi factori de evaluare a relației structură – activitate biologică, legată de tranzițiile configurationale ale ADN.

IV.2.5.3. ADN bicatenari ciclici cu molecule întrepătrunse

Asemenea tipuri de ADN s-au izolat din mitocondrii. Spre deosebire de ADN cromozomiali ai aceleiaşi celule, ADN mitocondrial diferă prin compoziția nucleobazelor, dimensiunea şi conformația lor. Aceşti ADN conținuți în cantități mici în mitocondriile din eucariote, sunt formați din doi monomeri bicatenari ciclici, întrepătrunşi (fig. IV.8).

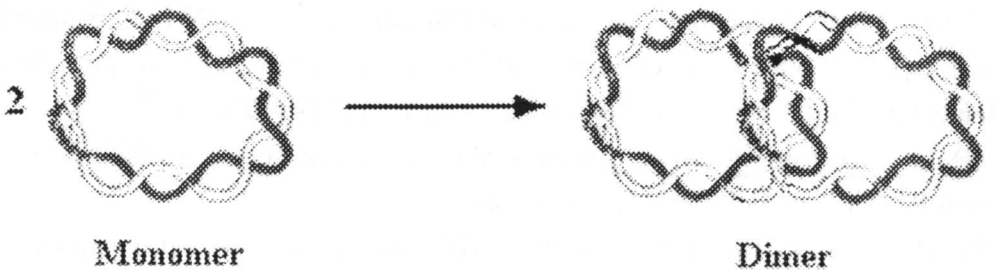


Fig. IV.8 ADN mitocondrial

În majoritatea cazurilor, ADN mitocondriali au mase de ~ 10^6 sau un multiplu mai mic de 10^6. Ca dimensiuni, se aseamănă cu ADN din micii bacteriofagi.

ADN mitocondrial uzual diferă de ADN nuclear al aceleiaşi celule, prin compoziția în nucleobaze.

În fiecare mitocondrie sunt prezente ~ 4-6 molecule de ADN, cantitatea totală de ADN mitocondrial fiind însă de sub 1%, raportată la ADN-ul total din celulele somatice. Doar o mică fracțiune din ADN-ul mitocondrial există sub formă de dimeri ciclici, rolul lor nefiind încă elucidat.

IV.2.6. Replicarea ADN

ADN bicatenar reprezintă atât informația cât şi materialul genetic pentru majoritatea organismelor procariote şi pentru toate eucariotele.

Modelul Watson – Crick sugerează că ADN bicatenar se poate replica direct, prima fază fiind separarea celor două panglici polinucleotidice.

Fiecare dintre cele două polinucleotide poate acționa direct ca o matriță pentru formarea catenei (panglicii) sale complementare, legată prin interacțiile perechilor de nucleobaze.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cele două panglici (parentale) ale moleculei "părinte" (vechi) se pot separa, iar panglica "soră" (nouă) complementară poate fi sintetizată pe suprafața fiecărei panglici parentale. Rezultă două molecule bicatenare de ADN, fiecare fiind constituită dintr-o catenă polinucleotidică veche şi o catenă complementară, nou sintetizată (fig. IV.9).

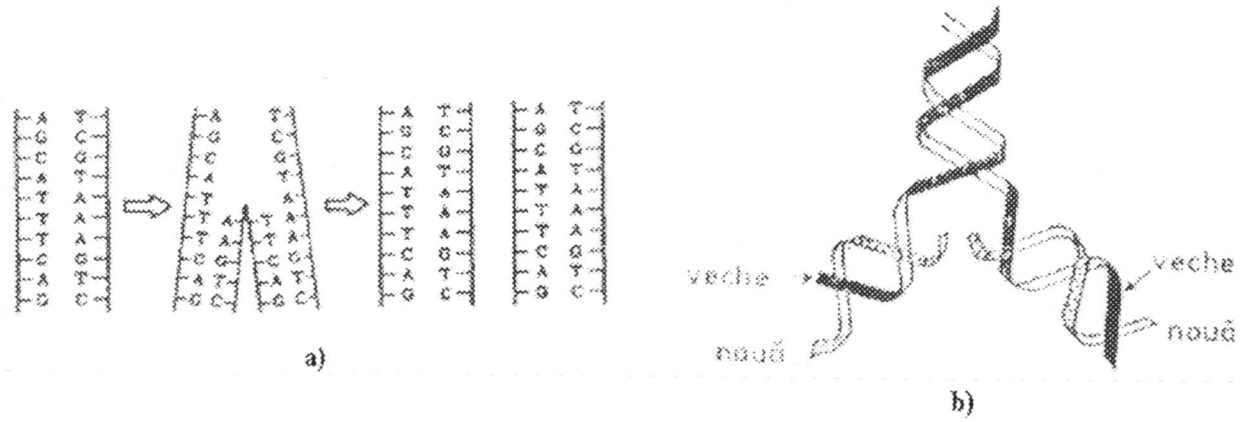


Fig. IV.9 Schema generală a replicării ADN
a) Principiu; b) Reprezentarea replicării semiconservative

O asemenea replicare este deci semiconservativă, în contrast cu o ipotetică replicare conservativă, care ar consta în sinteza a două copii duplex după ADN-ul părinte, acesta din urmă rămânând intact.

Natura semiconservativă a replicării ADN a fost demonstrată în 1958, de către M. Meselson şi F. Stahl.

Replicarea ADN are loc sub acțiunea a trei tipuri de enzime:

a) ADN endonucleaza, care produce scindarea moleculei bicatenare a ADN-ului originar;

b) ADN polimeraza, care utilizează fiecare dintre cele două panglici de ADN originar ca matrițe pentru catalizarea sintezei unor panglici complementare din deoxinucleotid-trifosfați (replicarea);

c) ADN ligaza, care catalizează legarea între ele a fragmentelor de ADN în sensul 5'-3'.

În locul de replicare (de scindare a celor două panglici) a ADN se formează o "furcă" cu două brațe bicatenare, fiecare braț fiind format ulterior dintr-o catenă de material nou şi una de material vechi (Cairns, 1962, 1966, 1973), după cum se observă din fig. IV.10.

Cele două catene noi ("fiice") trebuie să crească în direcții opuse, pentru că, la fel ca în catenele parentale, noile catene sunt antiparalele (cu polaritate inversă).

Lipsa ADN-ligazei sau rapiditatea creşterii împiedică sudarea fragmentelor de ADN; sinteza ADN se face discontinuu, sub formă de fragmente care se unesc în condiții normale, pentru a forma catene continue de ADN.

Dereglări genetice care au ca rezultat deficiența în ADN ligază fac ca fragmentele nucleotidice nesudate, scurte, de ADN să se acumuleze în celulă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

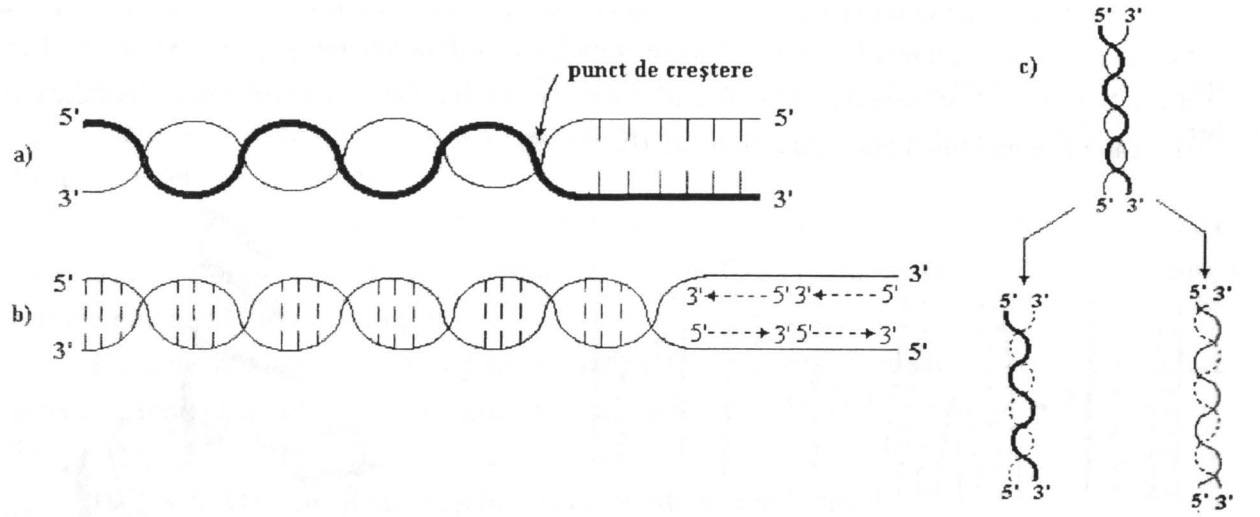


Fig. IV.10 Mecanismul replicării ADN

a) Formarea "furcii" în punctul de creştere (replicare);

b) Creşterea bidirecţională şi discontinuă a catenelor noi de ADN în sensul 5'----→3'

c) Rezultatul replicării: formarea a două molecule ADN "fiice" identice cu cea "părinte"

Kornberg şi colaboratorii au urmărit biosinteza in vitro a ADN şi au arătat că aceasta este catalizată de ADN polimerază, fiind respectate mai multe condiţii:

- unitatea structurală asamblată de către ADN polimerază pentru construcţia unor catene noi este un monomer: deoxiribonucleotid-5'-trifosfatul;

- este obligatorie prezenţa unei matriţe care să dirijeze asamblarea deoxiribonucleotidelor la locul potrivit. Această matriţă este însăşi molecula originară (parentală) de ADN;

- lungirea catenei are loc prin atacul nucleofil al grupei OH de la $C_{3'}$ din restul de deoxiriboză asupra fosforului nucleotidic, cu eliminare de pirofosfat anorganic.

Deci ADN polimeraza poate cataliza sinteza unor noi molecule de ADN numai pe modelul de ADN preexistent şi numai de la capătul moleculei de ADN parental cu o grupă OH liberă la $C_{3'}$.

Există trei varietăţi de ADN polimerază (sau Pol):

- ADN polimeraza I (Pol I) a fost descoperită în biosinteza ADN din extractele de *E. coli*. Ea cuplează deoxiribonucleotid-trifosfaţii, copiind matriţa ADN parental.

Pol I are specificitate pentru formarea perechilor de nucleobaze din modelul Watson – Crick.

Pe lângă acţiunea de a cataliza treptele succesive de polimerizare a deoxiribonucleotid-trifosfaţilor, Pol I poate acţiona şi invers, degradând ADN prin pirofosfoliză. Această reacţie inversă nu are probabil o semnificaţie fiziologică, deoarece in vivo există oricum o concentraţie redusă de acid pirofosforic rezultat prin acţiunea pirofosfatazei anorganice.

Pol I poate acţiona deci atât ca 3' → 5' exonuclează cât şi ca 5' → 3' exonuclează.

Pol I este o proteină cu masa de 109 kDa.

- ADN polimeraza II (Pol II) are masa de 120 kDa;

- ADN polimeraza III (Pol III) are masa de 140 kDa.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Pol II şi Pol III au fost descoperite în cazul mutanților din culturile de *E. coli*. Activitatea lor nu este detectabilă, deoarece se găsesc într-o cantitate foarte mică (<5%) în raport cu Pol I.

Kornberg a postulat că replicarea ADN începe sub acțiunea unei ADN-endonucleaze, care produce scindarea în catena 5'-3' a moleculei de ADN parental. În acest punct începe replicarea, prin ataşarea ADN polimerazei, care începe sinteza unei noi catene, pornind de la capătul cu OH liber la C_3 din deoxiribonucleotid-trifosfați. Are loc creşterea unei catene noi, pe modelul celei vechi, în direcția 5' → 3'. Apoi ADN polimeraza trece pe cea de a doua catenă "veche" rămasă liberă şi începe să sintetizeze (tot în direcția 5' → 3') o nouă catenă, complementară. Are loc astfel replicarea bidirecțională a moleculelor de ADN.

Ulterior, intervine din nou ADN endonucleaza, care scindează molecula de ADN exact la punctul de bifurcație, iar ADN polimeraza începe din acest punct să sintetizeze bidirecțional, succesiv, alte două noi catene. În acest fel, ambele catene antiparalele ale ADN sunt replicate discontinuu şi bidirecțional, prin jocul celor trei enzime: endonucleaza, ADN polimeraza şi ADN ligaza.

Cele mai multe cercetări asupra replicării ADN au fost făcute pe *Escherichia coli*.

Studii ulterioare (Wickner, Brutlag, Schekman, Kornberg, 1972) au arătat că la *E. coli*, în punctele de creştere a noilor catene, majoritatea fragmentelor de ADN au ataşate segmente de ARN. Replicarea ADN bicatenar circular include şi ea această particularitate.

Unele virusuri (fagul Φx174) au ca material genetic ADN monocatenar, în loc de ADN bicatenar. În acest caz, catena parentală notată cu (+) dă naştere în faza inițială a replicării la catena complementară (-); rezultă un ADN intermediar hibrid conținând ambele catene: (+) şi (-). Acest intermediar serveşte ulterior la replicarea catenei parentale (+).

În cazul eucariotelor, s-a arătat că replicarea ADN este tot semiconservativă, viteza de deplasare a punctelor de creştere fiind mai mare decât viteza de polimerizare a ARN sau a proteinelor (Callon, 1973).

Varietățile de nucleobaze metilate sau glucozilate găsite în ADN se formează prin metilare sau glucozilare enzimatică ulterioară biosintezei lanțurilor de ADN. Formarea unor asemenea baze în ADN poate fi un proces specio-specific pentru a proteja ADN împotriva acțiunii deoxiribonucleazei endogene.

Formarea acizilor deoxiribonucleici străini celulei este limitată sau împiedicată în timpul replicării, pentru că aceştia sunt degradați rapid de nucleaze endogene.

IV.3. Acizii ribonucleici (ARN)

Acizii ribonucleici joacă multiple roluri în celulele organismelor vii, aceste roluri fiind diferite de cele ale ADN. Spre deosebire de ADN, ARN au în compoziția lor, ca unitate glucidică, D-riboza, iar dintre bazele azotate conțin uracil (U) în loc de timină (T), deşi prezența acesteia din urmă nu este întotdeauna exclusă, ca de altfel şi exisența altor baze organice azotate, mai mult sau mai puțin modificate.

Moleculele ARN se caracterizează printr-o conformație dinamică, din care cauză pot îndeplini funcții diverse în celulă: rol structural, interacții extensive cu proteine specifice, funcții catalitice.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Criteriul clasic de clasificare a acizilor ribonucleici este rolul lor biologic, după care se disting trei categorii esențiale:

- ARN de transfer (ARNt) sau "solubil", cu moleculă relativ mică, având rolul de a transporta specific aminoacizii în procesul de biosinteză a proteinelor;

- ARN ribozomal (ARNr), complexat cu proteine sub formă de ribonucleoproteine, cuprins în locul de asamblare a peptidelor;

- ARN mesager (ARNm) sau ARNi (informațional), care corespunde "copiei" obținute grație procesului de transcripție a unui segment de ADN corespunzător unei gene. Această "copie" este "exportată" apoi din nucleu în citoplasmă, unde este tradusă de către ribozomi, pentru a realiza sinteza de proteine.

În celulele bacteriene, acizii ribonucleici se găsesc mai ales în citoplasmă.

În celulele hepatice ale animalelor, 11% din ARN totali se găsesc în nucleu (mai ales ARNm), 15% în mitocondrii (ARNt şi ARNr), peste 50% în ribozomi (mai ales ARNr) şi ~24% în citosol (mai ales ARNt).

ARN sunt prezenți în structura tuturor virusurilor plantelor, cel mai cunoscut fiind virusul mozaicului tutunului.

ARN s-au separat şi din unii bacteriofagi, ca bacteriofagul Qβ al *E. coli*, precum şi din unele virusuri ale animalelor (virusul poliomielitei).

ARN din virusurile bacteriilor, plantelor şi ale animalelor joacă rol de material genetic.

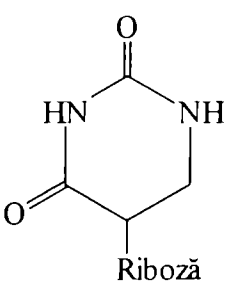
Virusul HIV şi virusurile oncogene sunt retrovirusuri compuse dintr-un singur segment de ARN care conține gena ce codifică revers-transcriptaza, o enzimă care catalizează transcripția reversebilă a ADN, plecând de la ARN. Acest ADN se poate multiplica în celula parazită şi se poate integra în dubla elice a ADN-ului celulei gazdă, unde el este capabil să sintetizeze (utilizând ARN-ul gazdei) noi retrovirusuri.

Principalele ribonucleotide din componența acizilor ribonucleici sunt: AMP, GMP, CMP şi UMP. În afară de acestea, s-au mai izolat şi ribonucleotide care conțin nucleobaze mai rar întâlnite (baze modificate), apărute după biosinteza ARN. Metilarea nucleobazelor (modificarea cea mai frecventă) conduce la creşterea diversității structurale a ARN.

S-a demonstrat astfel că una dintre caracteristicile fibrelor de ARNt este marea proporție (>20%) de baze hipermodificate post-translațional (peste 50 de asemenea nucleobaze).

Un exemplu de bază modificată este timina (care rezultă prin metilarea resturilor de uracil).

Pseudouridina (Ψ sau ΨU), întâlnită frecvent în structura secundară a ARNt, conține un rest de uracil înalt-modificat:



Pseudouridină

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Cele mai studiate din punct de vedere cantitativ au fost nucleobazele din ARN de transfer, rezultatele depinzând şi în acest caz de sursa biologică de proveniență (tabel nr. IV.11):

Tabel nr. IV.11

Proporții molare ale nucleobazelor din unele tipuri de ARN

Sursa şi tipul de ARN	A	G	C	U	Ψ	Baze metilate
Escheridia coli (ARNm)	25,1	27,1	24,1	23,7	--	--
E. coli (ARNt)	20,3	32,1	28,9	15,0	2,1	1,6
E. coli (ARNr)	25,2	31,5	21,6	21,7	--	--
Drojdie (ARNt)	19,4	26,6	25,1	20,1	4,6	3,1
Ficat de iepure (ARNt)	16,6	31,1	27,8	15,9	4,3	3,5

Evaluările cantitative s-au făcut după hidroliza ARN, urmată de determinări fizico-chimice (Duchesne, 1973).

IV.3.1. Structura primară a ARN

Pentru a se pune în evidență modul de legare dintre ribonucleotide, s-a efectuat hidroliza alcalină a ARN. S-a astabilit astfel că, în majoritatea cazurilor, legătura fosfodiesterică din catena polinucleotidică se formează la atomii C_5· şi C_3· ai D-ribozei (fig. IV.11).

La ARNt al alaninei ($ARNt^{Ala}$) din levuri, Holley şi alții (1965) au făcut prima determinare de structură primară.

În unele molecule s-au mai identificat şi legături fosfodiesterice între C_2· şi C_5· din resturile de D-riboză. Aplicând metoda scindării ARN cu enzime degradative, s-au determinat atât secvența ribonucleotidelor din macromoleculă cât şi grupele terminale ale lanțurilor poliribonucleotidice.

La pH fiziologic, ARN se prezintă ca nişte molecule polianionice, resturile de fosfat fiind ionizate.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

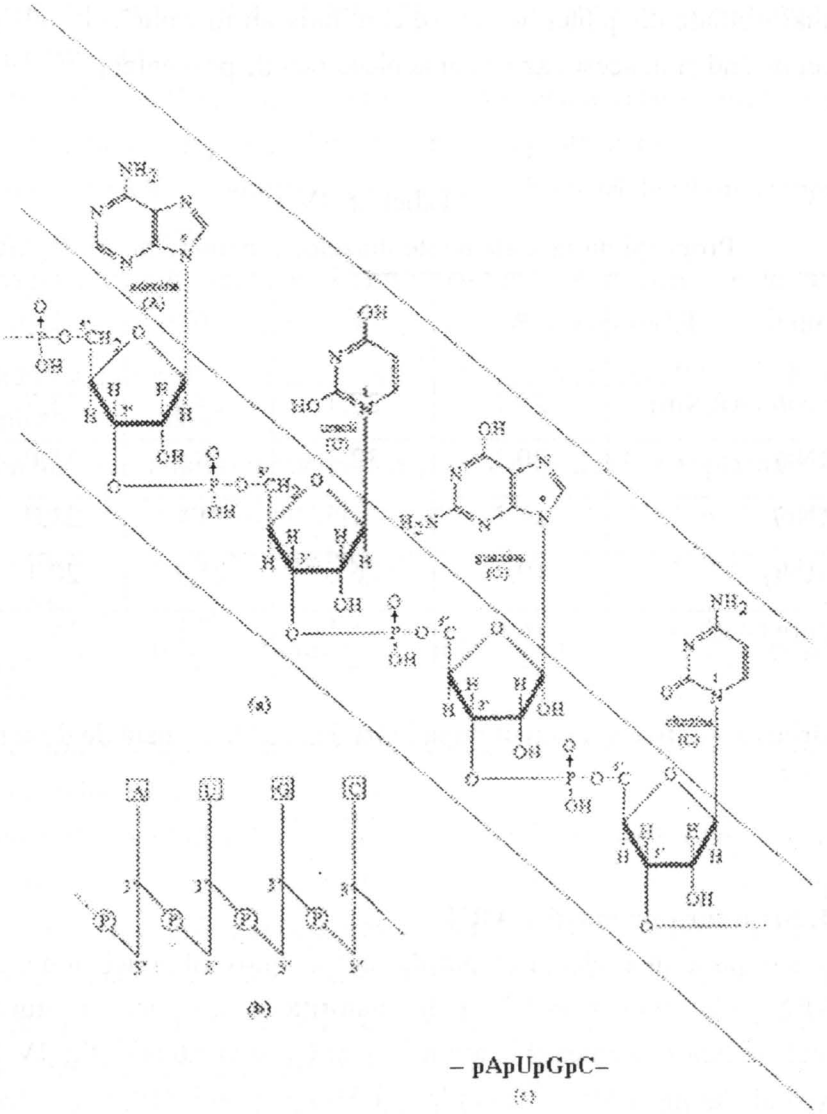


Fig. IV.11 Fragment din structura monocatenară a ARN
a) Formula unei catene tetraheteroribonucleotidice; b) Prezentarea schematică a catenei;
c) Prezentarea literală (abreviată)

IV.3.2. Structura secundară a ARN

Structura secundară a ARN a fost mai puțin investigată decât cea a ADN, cei mai studiați fiind ARNt. La aceştia, s-a pus în evidență existența unei structuri bicatenare, în acele regiuni ale moleculei în care se pot forma legături de hidrogen între perechi de nucleobaze complementare, situate pe aceeaşi catenă polinucleotidică.

S-a observat că mărirea tăriei ionice a mediului conduce la contractarea lanțurilor polinucleotidice, ceea ce are efect de depresie a viscozității şi de creştere a constantei de sedimentare (Spirin, 1963, Fresco, 1963). Această "contractare" se datorează structurii bicatenare parțiale a moleculei de ADN, care-i măreşte flexibilitatea.

În fig. IV.12 este ilustrată structura secundară a ARN.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

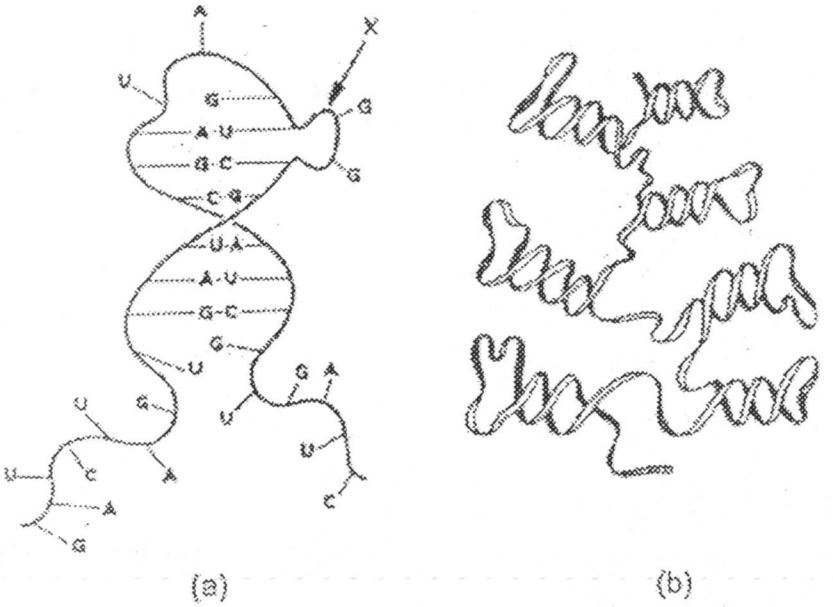


Fig. IV.12 Modele de structură secundară a ARN (1963)
a) modelul Spirin; b) modelul Fresco

Structura helicală a ARN se aseamănă deci mai mult cu structura ADN-A; de aceea este cunoscută şi drept ARN-A sau ARN-11, deoarece conţine 11 perechi de nucleobaze pe tură, o înălţime a turei de 30Å (3nm), iar perechile sale de baze sunt înclinate faţa de axa helixului cu ~14°.

În afară de ARNt, această structură secundară este adoptată şi de unii ARNr.

Apariţia unor zone în spaţiu cu structură secundară s-a demonstrat prin posibilitatea asocierii dintre lanţurile monocatenare poli(A) şi poli(U), obţinute prin polimerizarea ATP şi respectiv UTP, în prezenţa polinucleotid-fosforilazei, când s-a evidenţiat formarea unei structuri bicatenare poli(A) – poli(U).

Asocierea face ca în spectrele electronice de absorbţie (UV) să apară, ca şi în cazul ADN bicatenar, un efect hipocrom la $\lambda = 260$nm.

În cazul ARNr şi ARN din virusul mozaicului tutunului (VMT) s-a evidenţiat faptul că lanţurile poliribonucleotidice prezintă în unele porţiuni din spaţiu plieri care fac posibilă apariţia de legături de hidrogen de tip A-U şi G-C şi deci o structură secundară. Datorită perechilor complementare A-U şi G-C, regiunile monocatenare ale ARN sunt întrerupte de porţiuni cu structură dublu helicală.

În regiunile helicale sunt angajate ~40-70% din ribonucleotide (Davidson, 1972).

Lipsa continuităţii structurii secundare explică de ce raportul A-U/G-C nu este unitar.

Procesul sintezei ARNm pe tiparul ADN, cel mai bine studiat la procariote este aplicabil in linii mari şi la eucariote, enzimele şi semnalele reglatoare fiind însă diferite. Acest proces va fi descris mai departe, în cadrul secţiunii consacrate ARNm.

În 1965, R. Holley a raportat, după 6 ani de efort, prima secvenţă a bazelor cunoscută dintr-un acid ribonucleic important şi anume ARNt al alaninei ($ARNt^{Ala}$) din drojdie.

El a arătat că, datorită structurii secundare parţial dublu helicală, molecula $ARNt^{Ala}$ posedă patru zone complementare, care generează în anumite porţiuni ale moleculei o structură

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

secundară denumită "rigidă", ca rezultat al formării unui număr total de 20 de legături de hidrogen între nucleobazele complementare, din porțiunile dublu-helicale.

Între zonele complementare (dublu helicale) apar "bucle" sau brațe, ceea ce face ca $ARNt^{Ala}$ să adopte o structură "în treflă" (sau "frunză de trifoi"), după cum se observă din fig. IV.15.

Amănunte despre compoziția şi rolul biologic al acestei structuri în biosinteza proteinelor, vor fi expuse în secțiunea referitoare la ARNt.

Dupa modelul Holley, structura de "frunză de trifoi" a fost atribuită ulterior tuturor ARNt cunoscuți, ea fiind direct legată de importanța acestor acizi ribonucleici pentru biosinteza proteinelor celulare.

IV.3.3. Structura terțiară a ARN

Primele investigații fizico-chimice ale acizilor ribonucleici au arătat ca aceştia au o structură secundară bine definită.

Cu toate studiile hidrodinamice, spectroscopice şi chimice (încercări de reticulare), structura lor tridimensională (terțiară) a rămas o enigmă până în 1974. În acest an, investigarea structurii cristaline cu raze X de 0,25nm a $ARNt^{Phe}$ din drojdie, a permis elucidarea separată a acesteia de către A. Rich în colaborare cu S. Hou Kim pe de o parte şi de către A. Klug (pentru alte cristale de ARNt), pe de altă parte.

În urma acestor investigații s-a arătat că molecula îşi asumă o structură tridimesională în formă de litera L, în care un braț al literei este format dintr-o structură continuă de ARN-A, iar celălalt braț are o compoziție similară cu brațele "D" şi "anticodon" din structura secundară a ARNt (fig. IV.13). Fiecare braț al literei L are o lungime de ~60Å (6nm), acceptorul de aminoacizi şi anticodonul fiind plasate la extermitățile opuse ale moleculei, fiecare având o lungime de 7,6nm. În fig. IV.13 este reprezentată această structură în formă de L, obținută pe baza difracției cu raze X.

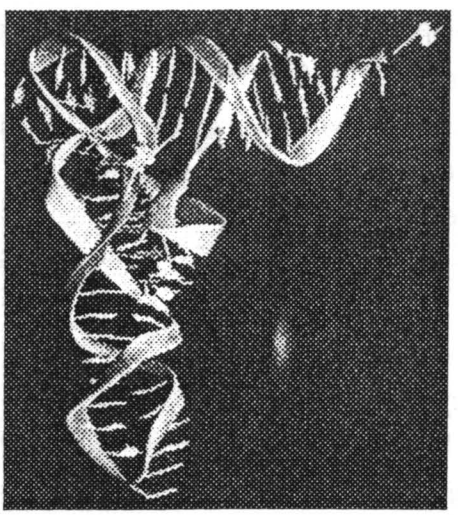


Fig. IV.13 Structura terțiară a $ARNt^{Phe}$

Lățimea de 2-2,5nm a moleculei de ARNt este esențială pentru funcția sa biologică, în timpul biosintezei proteinelor, două molecule de ARNt putându-se lega simultan în proximitate, la codonii adiacenți acidului ribonucleic mesager (ARNm).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Stabilitatea structurii terțiare a ARNt este menținută prin legături de hidrogen și interacții nepolare apărute prin stivuirea bazelor azotate. Astfel, la $ARNt^{Phe}$ din drojdie, doar 42 din cele 76 de baze ale sale participă la formarea celor două brațe, dublu-helicale, ale literei L, pe când 71 dintre baze interacționează prin legături hidrofobe, datorate stivuirii lor în spațiu.

Multe dintre nucleobazele implicate în aceste tipuri de interacții sunt invariabile sau semivariabile. La stabilizarea structurii terțiare mai participă și legături de hidrogen neuzuale, dintre bazele azotate și grupele fosfat sau grupele OH libere de la C_2· din resturile de riboză.

Numărul mare de asocieri intramoleculare conferă $ARNt^{Phe}$ o structură terțiară compactă, făcându-l practic inaccesibil față de solvenți.

Excepția cea mai notabilă o reprezintă aranjarea nucleobazelor din brațul anticodon al structurii secundare "în trifoi" și a celor din brațul pentru aminoacizi (terminat în secvența –C–C–A) din fig. IV.15; aceste două brațe trebuind să rămână accesibile, pentru a-și îndeplini funcția în biosinteza proteinelor.

Pentru diferiți ARNt din drojdie, structurile terțiare s-au dovedit asemănătoare. Diferența cea mai importantă dintre ele este gradul de flexibilitate aparentă a regiunii anticodon și a terminalului pentru aminoacizi (–C–C–A).

Aceste observații sunt în acord cu presupunerea că toți ARNt au acces la aceleași cavități ribozomale.

IV.3.4. Tipuri de ARN

Heterogenitatea structurii acizilor ribonucleici, legată de prezența predominantă a formei monocatenare flexibile (cu posibilitate de pliere) ca și a unor regiuni bicatenare, influențează rolul lor biologic.

Atât în celulele procariotelor cât și în cele ale eucariotelor, sunt prezente trei clase (tipuri) principale de ARN, care se deosebesc prin funcțiile lor biologice: ARNt, ARNm și ARNr.

Fiecare dintre aceste clase are mai multe specii moleculare (ARNr – cel puțin trei, ARNt – aprox. 60, iar ARNm – între sute și mii de forme).

În tabelul nr. IV.12 sunt redate principalele caracteristici ale celor trei tipuri de acizi ribonucleici.

Tabel nr. IV.12

Caracteristici ale principalelor tipuri de ARN

Tipul de ARN	Număr aprox. de specii	Constante de sedimentare (S)	Masa moleculară · 10^6 (Da)	Număr de nucleotide	Compoziția în nucleobaze	Rata de ARN total (%)
ARNm	100 - 1000	6,25	0,025 – 1,0	75 - 3000	A, U, G, C	2 - 10
ARNt	60	4	0,023 – 0,030	75 - 90	A, U, G, C baze metilate și tiolate	10 - 20
ARNr	3	5 - 7	0,035	100	A, U, G, C baze metilate	75 - 85
		16 - 18	0,550	1500		
		23 - 28	1,100	3100		

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

În afară de aceste tipuri principale, mai există şi un gen de ARN cu masă moleculară mică şi distribuţie restrânsă, denumit ARN nuclear scurt (ARNsn).

IV.3.4.1. ARN mesager (ARNm)

ARNm sunt formaţi dintr-o singură catenă rectilinie, care corespunde "copiei" obţinute graţie procesului de transcripţie a unui segment de ADN, corespunzător unei gene.

ARNm, denumiţi şi ARN de informaţie (ARNi) sunt sintetizaţi în nucleul celular, având rol în preluarea şi vehicularea informaţiei genetice de la ADN cromozomial, în procesul de transcripţie, în vederea biosintezei proteinelor. O cantitate mică de ARNm se găseşte în mitocondrii, activitatea sa fiind corelată cu cea a ARNt.

Conform observaţiilor făcute de către Jacobi şi Monod, s-a ajuns la concluzia că sinteza proteinelor celulare decurge în două etape:

a) genele structurale de pe ADN sunt transcrise pe panglici complementare de ARNm;

b) după transcripţie, ARNm sintetizat în nucleu este "exportat" în citoplasmă.

În procesul sintezei directe a polipetidelor pe ribozomi, ARNm se asociază temporar cu aceştia.

ARNm conţine ca nucleobaze doar A, G, C şi U, care sunt complementare cu cele de pe panglica ADN templat ("matriţă").

ARNm "exportat" în citoplasmă după sinteza sa, traversează ribozomii, servind la rândul lor ca matriţă pentru ordinea scvenţială a aminoacizilor din proteinele biosintetizate. Tripletele de nucleotide (codoni) aliniază catena ARNm cu aminoacizii specifici din secvenţa proteinei, conform codului genetic.

ARNm reprezintă o foarte mică fracţiune din ARN total celular, dar masa acestor acizi ribonucleici ca şi secvenţa nucleobazelor din structura lor primară variază în funcţie de specie, în limite destul de largi (de ordinul 10^3), ceea ce reflectă deosebirile mari dintre lungimile genelor (fragmentelor de ADN) a căror secvenţă o copiază.

Dintre cele patru baze azotate din compoziţia ARNm (A, G, C, U) predomină suma A+U (peste 55%).

Secvenţa bazelor din catena ARNm este complementară secventei din ADN transcris. În procesul transcripţiei, se formează hibrizi ARNm – ADN, care confirmă acest mecanism.

Iacob şi Monod (1961), cei care au postulat existenţa tipului distinct de ARNm, au postulat şi o serie de caracteristici generale ale acestora, confirmate ulterior:

- posibilitatea de asociere temporară cu ribozomii (cu sistemul poliribozomal) în scopul sintezei proteinelor;
- caracterul lor heterogen, care reflectă marea varietate a proteinelor la a căror sinteză participă;
- compoziţia lor în nucleobaze trebuie să reflecte (cu excepţia U) pe aceea a ADN al cărui mesaj genetic îl copiază, devenind la rândul lor purtători de informaţie ereditară;
- în ceea ce priveşte activitatea biologică, turn-over-ul ARNm este mult diferit (de la câteva minute pentru procariote la ore pentru eucariote), ceea ce reflectă gradul diferit de complexitate a organismelor vii.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Biosinteza ARNm are loc în prezența ARN polimerazei ADN – dependente; în cursul ei, se formează o secvență ribonucleotidică complementară ADN-ului templat. Acest lucru s-a dovedit prin faptul că, in situ, în absența ADN, ARN-polimerazele nu conduc la polimerizarea specifică a ribonucleotidelor.

ARN polimeraza a fost descoperită independent, de către S. Weiss şi J. Hurwitz. Această enzimă cuplează simultan ribonucleozid-trifosfații: ATP, CTP, GTP şi UTP pe matrițele de ADN, într-o reacție care se poate schematiza astfel:

$$(ARN)_{n\ resturi} + \underbrace{NTP}_{\text{nucleosid-trifosfat}} \rightleftharpoons (ARN)_{n+1\ resturi} + PP_i$$

cu hidroliza ulterioară a PP_i.

Toate celulele conțin ARN polimerază. Diverşi bacteriofagi generează ARN polimeraze, fiecare dintre ele sintetizând o clasă diferită de ARN.

Cel mai mult a fost studiată ARN polimeraza din *E. coli*, o holoenzimă cu masa de ~480kDa, tetramer, care reclamă prezența ionilor de Zn^{2+} şi Mg^{2+}

La *E. coli*, ARN polimeraza ADN dependentă este formată din patru subunități: două identice (subunități α) şi două asemănătoare, dar neidentice (denumite subunități β şi β'). Forma activă a enzimei se constituie prin atașarea la tetramerul ARN polimerazei a unei alte subunități proteice (subunitate σ, factor σ).

Rolul factorului σ este de a recunoaşte promotorul (un segment de 5-10 perechi de nucleotide care se află în vecinătatea imediată a oricărei gene transcriptibile şi constituie situsul de legare a ARN polimerazei), în etapa de inițiere a biosintezei ARN. Factorul σ ajută deci la fixarea ARN-polimerazei ADN-dependente pe o moleculă de ADN bicatenar.

Pe locul din ADN în care enzima se fixează specific, are loc o depliere a celor două panglici polideoxiribonucleotidice, dintre care numai una funcționează ca matriță în procesul de transcripție ("catena de sens a genei"). Cealaltă panglică este denumită catenă antisens.

După inițierea transcrierii, factorul σ se eliberează de holoenzimă, reasociindu-se cu alta disponibilă, pentru a iniția sinteza unei noi molecule de ARN. Elongarea catenei ARN, care începe de la capătul său 5' către capătul 3', prin polimerizarea ATP, GTP, CTP şi UTP rămâne pe seama enzimei (ARN polimeraza). Aceasta se deplasează de-a lungul catenei de sens a genei de la capătul 3' la 5', catalizând polimerizarea celor patru ribonucleotide într-o secvență specifică, dictată de tiparul catenei sens şi interpretată de regulile bazelor perechi. Procesul este însoțit de eliberarea unui mare număr de molecule de pirofosfat (PP_i) – fig. IV.14.

Întreruperea transcrierii este determinată de o secvență specifică de baze din catena sens a moleculei ADN (terminatorul), recunoscută ca un semnal de o proteină specifică numită factorul ρ şi definitivată prin desprinderea de pe matrița ADN a ARN sintetizat şi a ARN polimerazei ADN-dependente, care asistată de alt factor σ, declanşează sinteza unei noi molecule de ARN.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

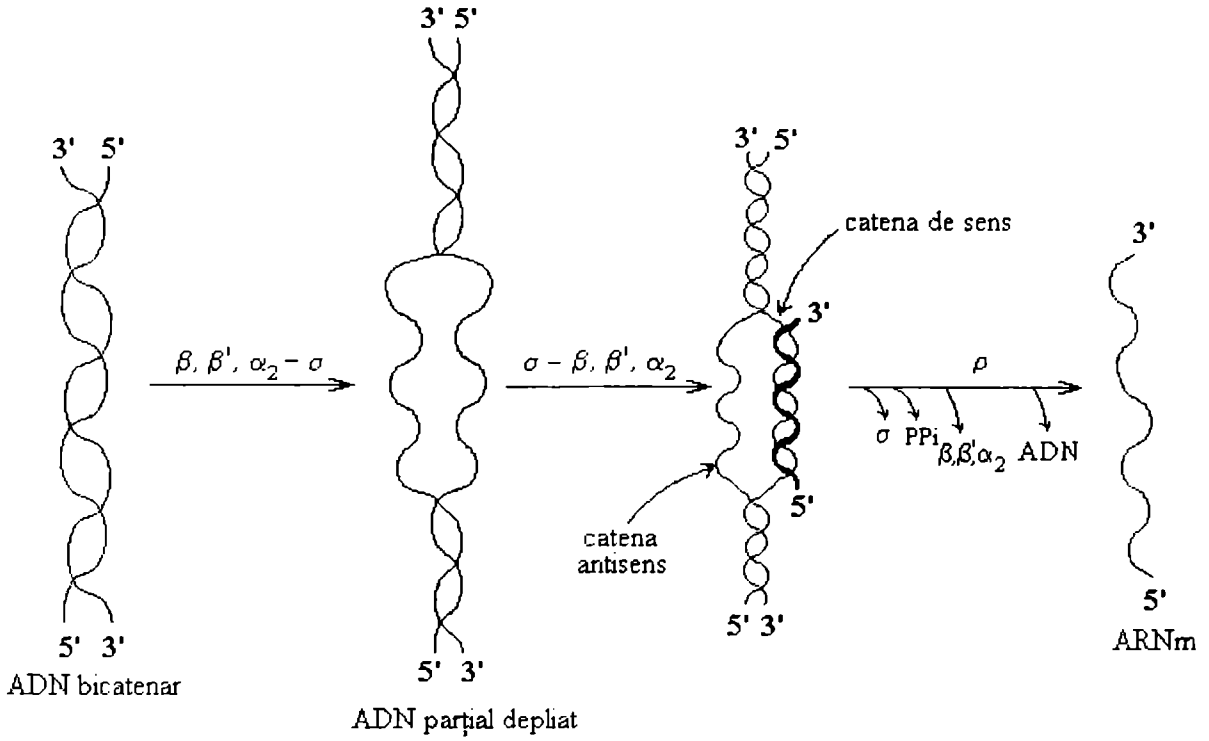


Fig. IV.14 Schema transcripției ADN pe ARNm

La procariote, ARN polimeraza ADN-dependentă sau transcriptaza este o enzimă unică, cu rolul de a cataliza sintezele ARNm, ARNt şi ARNr.

Nucleele celulelor eucariote conțin trei tipuri distincte de ARN polimeraze, proteine cu mase moleculare cuprinse între 500 şi 700 kDa:

a) ARN polimeraza I (sau A) este localizată în nucleoli (care conțin genele ribozomale) şi catalizează sinteza precursorilor majorității ARNr;

b) ARN polimeraza II (sau B) din nucleoplasmă, care sintetizează ARNm (de origine cromatiniană);

c) ARN polimeraza III (sau C), tot din nucleoplasmă şi tot cromatiniană, care sintetizează precursorii ARNr, ARNt şi o varietate de alți ARN nucleari scurți (ARNsn) şi citosolici.

În plus, celulele eucariote conțin separat şi ARN polimeraze mitocondriale şi din cloroplaste.

Structura cuaternară a ARN polimerazelor din eucariote este foarte complexă, fiecare enzimă conținând câte două subunități neidentice ("mari"), cu masa >100kDa şi până la peste 12 subunități diferite "mici", cu masa <50kDa.

ARNm mascat

Se ştie că dezvoltarea fiecărui embrion este guvernată aproape în întregime de informația prezentă în ou, înainte de fertilizare. Astfel, prin expunerea embrionului de arici de mare la acțiunea actinomicinei D (care inhibă sinteza ARNm, fără a bloca biosinteza ADN), se observă o dezvoltare normală în primele stadii, fără o modificare în programul său de sinteză a proteinelor. Acest lucru se datorează faptului că un ou nefertilizat conține cantități mari de ARNm, care este mascat printr-o asociere cu proteine, care previne asocierea sa cu ribozomii prezenți în ou.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

După fertilizare, acest ARNm este "demascat" într-un mod controlat şi începe să direcţioneze sinteza proteinelor. În acest fel, dezvoltarea embrionului poate începe imediat după fertilizare, într-un ritm mai rapid decât ar fi necesar pentru biosinteza unui ARNm specific.

Citoplasma unui mare număr de celule eucariote conţine mari cantităţi de ARNm mascaţi prin complexare cu proteine şi neasociaţi cu ribozomii.

ARN nuclear scurt (ARNns)

În tratatele de Biologie moleculară şi de Biochimie de după 1980, au început să fie incluse, pe lângă cele trei tipuri principale de ARN (ARNt, ARNm şi ARNr) şi alte tipuri, printre care şi un ARN izolat din nucleul celular, care conţine 100 – 200 ribonucleotide bogate în uracil. S-au izolat 7 subtipuri diferite, notate cu U_1, U_2, ..., U_7.

Acest ARN care posedă o catenă polinucleotidică relativ scurtă a fost denumit ARN nuclear "mic" sau "scurt" (ARNsn). Se consideră că acest tip de ARN are un rol important în formarea şi maturarea ARNm biologic activ.

Nucleele celulelor eucariote conţin numeroase copii ale unor acizi ribonucleici compuşi din 60 – 130 nucleotide înalt – conservate, care reprezintă ARNsn. Ele formează complexe cu proteine, denumite ribonucleoproteine nucleare.

Distrugerea acestor ARNsn (precursori ai ARNm) împiedică polimerizarea ribonucleotidelor într-o secvenţă specifică şi deci formarea ARNm, ceea ce dereglează mesajul genetic al celulei, putând declanşa boli autoimune ca lupusul eritematos sistemic (LES).

ARN nuclear heterogen (ARNhn)

Principala diferenţă dintre structurile genelor procariotice şi eucariotice este aceea că secvenţele majorităţii genelor eucariotice sunt întrerupte de regiuni necodificante. Astfel, investigări ale transcripţiei genelor structurale eucariotice au dus la rezultatul surprinzător că transcripţiile primare sunt cât se poate de heterogene ca mărime (de la ~2000 la peste 20.000 de nucleotide) şi că sunt mult mai mari decât ar fi de aşteptat dacă se iau în considerare proteinele eucariotice.

Experienţe cu molecule marcate radioactiv au arătat că o mică parte dintre aceşti aşa-zişi ARN nucleari heterogeni (ARNhn) este transportată în citosol; majoritatea dintre aceştia se întorc rapid în nucleu. De aceea, numai un număr mic de ARNhn apare printre ARN citosolici.

Se presupune că ARNhn ar fi precursori ai ARNm, necodificaţi în întregime; ei au secvenţe codificate (exoni) alternând cu porţiuni necodificate (introni), acestea din urmă fiind mai lungi.

La genele vertebratelor, intronii conţin 60-100.000 de nucleotide fără periodicitate evidentă.

Investigaţiile au stabilit că formarea ARNm eucariotici începe cu transcripţia unei gene structural întregi, incluzând şi intronii săi. Acest precursor este apoi supus unui mecanism de excizie care înlătură intronii, unind capetele exonilor. Rezultă astfel un ARN matur, codificat, în care ordinea exonilor este aceeaşi ca la gena din care provin.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.3.4.2. ARN de transfer (ARNt)

ARNt denumiți și acizi ribonucleici solubili (ARNs) au mase moleculare relativ reduse (23-30 kDa) și o constantă de sedimentare (c.s.) de ~4S. Continutul în ARNt reprezintă ~15% din ARN celular total.

Moleculele relativ mici ale ARNt acționează ca purtători specifici de aminoacizi în procesul biosintezei proteinelor pe ribozomi. ARNt conțin 75-90 monoribonucleotide, fiecăruia dintre cei 20 aminoacizi naturali corespunzându-i cel puțin un ARNt, iar unora multipli ARNt.

ARNt caracteristici conțin și baze minore (modificate) (până la 10% din totalul nucleobazelor), alături de bazele azotate majore (A, G, C și U).

A. Structura primară a ARNt are anumite particularități:

- la un capăt al catenei poliribonucleotidice, toți ARNt conțin un rest de acid guanilic (pG), legat prin grupa OH de la C_3· la penultima nucleotidă. Acest acid guanilic terminal conține o grupă extrafosfat la atomul C_5· al restului său de riboză;
- la celălalat capăt al lanțului, tot ARNt conține o secvență trinucleotidică comună pCpCpA. Grupa OH de la C_5· al acidului adenilic terminal este legată cu restul precedent de acid citidilic (pC); acidul adenilic are în schimb grupe OH libere la atomii C_2· și C_3· din restul său de riboză. Deci structura primară a ARNt se poate prezenta la modul general astfel:

$$pG(pN)_{75\text{-}90}pCpCpA-OH$$

$$5' \longrightarrow 3'$$

Grupele OH de la C_2· libere ale restului de acid adenilic terminal din secvența pCpCpA a ARN se esterifică enzimatic cu un α-aminoacid specific, conducând la forma activă de transfer, denumită aminoacil-ARNt:

$$pG(pN)_{75\text{-}90}pCpCpA-O-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{R}{|}}{CH}-NH_2$$

Acest rest de aminoacid este apoi transferat enzimatic pe partea terminală a lanțului peptidic format pe suprafața ribozomului.

Majoritatea ARNt s-au izolat în formă omogenă, unii chiar sub formă cristalină.

B. Structura secundară caracteristică majorității ARNt este cea în formă de "frunză de trifoi" sau "treflă" (Holley și alții, 1965), după cum se poate observa din fig. IV.15.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

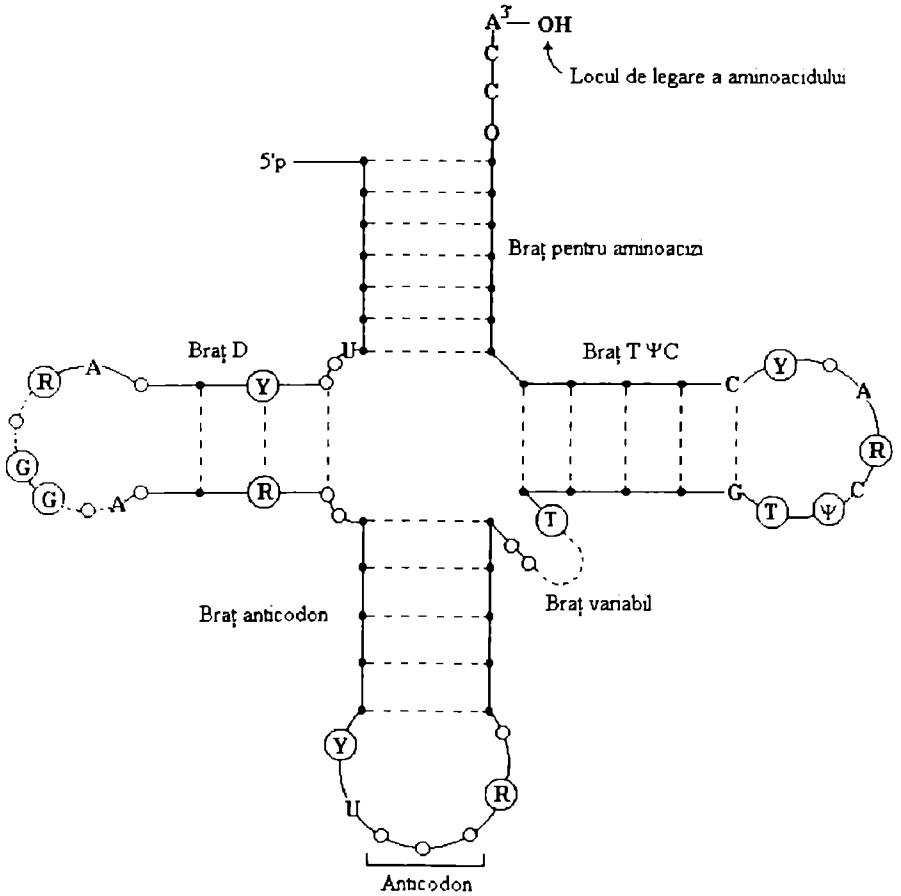


Fig. IV.15 Structura secundară a ARNt

• – baze împerecheate după modelul Watson-Crick

o – baze neîmperecheate după modelul Watson-Crick

R – purine invariabile; Y – pirimidine invariabile

Regiunile încercuite din brațul variabil şi din brațul D conțin numere diferite de nucleotide, în funcție de natura ARNt.

Plecând de la capătul 5' al lanțului poliribonucleotidic, această structură prezintă mai multe trăsături, comune tuturor ARNt.:

1° O grupă terminală fosfat la hidroxilul de la C_5· din restul de D-riboză.

2° O "tulpină" (sau un "braț") cu 7 perechi de nucleobaze, care include şi nucleotida 5'-terminală şi care poate conține şi alte nucleobaze decât cele majore ca G ... U. Acest ansamblu este cunoscut ca acceptor sau braț pentru aminoacizi, pentru că restul de aminoacid transportat de ARNt este legat la grupa sa terminală de la C_3·.

3° Un braț terminal format din trei sau patru perechi de baze, conținând frecvent ca bază modificată dihidrouridina (brațul D).

4° Un braț opozabil celui pentru aminoacizi, care conține 5 perechi de nucleobaze, terminat cu aşa-numitul anticodon. Pe anticodon există un triplet de baze complementare cu codonul specific al ARNm, care codifică aminoacizii inserați în secvența polipeptidelor. Acesta este brațul anticodon.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

5° Un braț format din 5 perechi de baze azotate, care conține frecvent secvența TΨC (opozabil brațului D), denumit brațul TΨC (Ψ = pseudouridină).

6° Toți ARNt se termină în secvența C–C–A cu o grupă OH liberă la atomul C_3· al restului de riboză terminal.

7° Există 13 poziții nevariabile (toate au aceeași bază) și 8 semivariabile (numai cu o purină sau numai cu o pirimidină). Aceste regiuni mai conțin și invariabile corelate; acestea sunt perechi de nucleotide care nu fac parte din brațe, prezente în toți ARNt. Astfel, purina din poziția 3' a anticodonului este modificată invariabil.

8° Situsul cu cea mai mare variabilitate din structura secundară a ARNt cunoscuți este așa-zisul braț variabil. El poate avea 3 – 21 nucleotide și poate fi compus din până la 7 perechi de baze complementare. Acest braț variază în lungime de la 5 la 7 nucleotide.

Funcțiile multor baze modificate din ARNt rămân încă necunoscute.

C. Structura terțiară a ARNt a fost prezentată în secțiunea IV.3.3.

IV.3.4.3. ARN ribozomali (ARNr)

ARNr au fost izolați din ribozomii citoplasmatici (corpusculii sau granulele lui Palade, 1953). În ribozomi, ARNr este conținut în proporție de 75 – 85% din totalul ARN celular, în funcție de sursa biologică.

Ribozomii sunt structuri supramoleculare, formate din mici particule ribonucleoproteinice, cu diametre de 10 – 15 μm, care conțin ARNr și proteine cu masă moleculară mică; ei sunt esențiali pentru biosinteza proteinelor din aminoacizi. Ribozomii se pot găsi dispersați în citoplasmă (polizomi) sau fixați pe suprafața reticulului endoplasmatic granular, constituind ergastoplasma (sediul sintezei și maturării proteinelor).

Unele organite celulare (mitocondrii, cloroplaste) au ribozomi proprii.

Centrul sintezei ARNr și asamblării ribozomilor sunt nucleolii (structuri refringente localizate în nucleele celulelor). Nucleolii sunt bogați în ARN și proteine, dar conțin și mici cantități de ADN. Frecvent, nucleele au mai mult de un nucleol, cel mai adesea – doi.

După cum s-a demonstrat prin marcare radioactivă, în nucleoli ARNr sunt procesați post-transcripțional și asamblați cu proteine ribozomale sintetizate citoplasmatic, cu formare de subunități ribozomale imature. Asamblarea finală a acestor subunități are loc numai dacă sunt transferate în citoplasmă, ceea ce previne probabil translarea prematură a ARNm parțial procesați în nuclee.

Observații experimentale au arătat că transcripția selectivă este responsabilă în mare măsură de sinteza unor cantități diferite de proteine din celulele aceluiași organism (J. Darnell, 1981).

Fiecare ribozom conține, în afară de proteine, trei ARNr diferiți.

- La procariote, robozomii pot disocia în două subunități, cu constantele de sedimentare (c.s.) 50S și respectiv 30S.

a) Subunitatea 50S conține două specii moleculare de ARNr, cu masa moleculară de ~1200kDa (c.s.=23 – 28S) și 30 – 36kDa (c.s. = 5S), asociate cu aproximativ 30 proteine diferite.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

b) Subunitatea 30S conține un ARNr cu masa ~50 – 550kDa (c.s. = 16 – 18S) și ~20 proteine diferite.

Secvența nucleotidelor și gradul de polimerizare la speciile de ARNr procariotice depind de specificul metabolismului celular.

- La eucariote, ribozomii au c.s. = 80S și disociază în două subunități (c.s = 60S și respectiv 50S).

a) Subunitatea 60S formează două specii moleculare de ARNr cu c.s. = 5,7S și 28S.

b) Subunitatea 50S formează o singură specie de ARNr, cu c.s. = 18S.

În funcție de condițiile fizice din mediu (temperatură, concentrație etc.), conformația ARNr poate fi un lanț monocatenar dezordonat, cu domenii liniare, helicale, cu retroplieri sau compactate. De exemplu, la temperatura camerei și concentrație moderată, apare structura helicală (40 – 60%), iar la temperaturi mai mari – forma de ghem.

Indiferent de specie, continutul ARNr în bazele G și C este superior (G + C > A + U), raportul A + U/G + C având variații mari în domeniul 0,50 – 0,74. Cu cât valoarea acestui raport este mai ridicată, va crește ponderea structurii helicale în raport cu cea liniară.

IV.3.5. Biosinteza proteinelor

În 1955, F. Crick a postulat că în sinteza proteinelor specifice trebuie să aibă loc o translație a secvențelor ADN, prin medierea unor molecule "adaptoare", fiecare asemenea adaptor transferând un aminoacid specific și recunoscându-și codonul corespunzător (fig. IV.16).

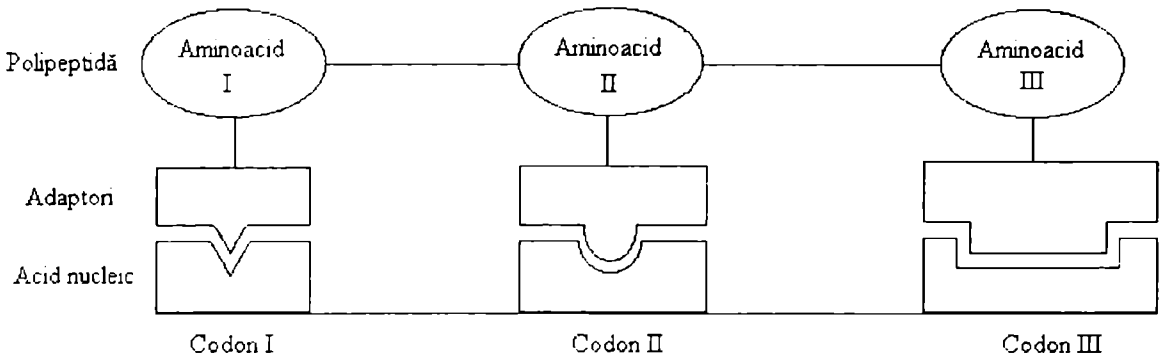


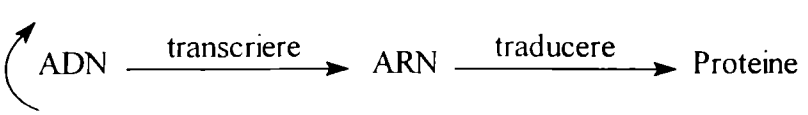
Fig. IV.16 Schema biosintezei proteinice postulată de F. Crick

F. Crick a sugerat că adaptorii conțin ARN, deoarece recunoașterea codonului poate decurge prin perechi complementare de baze azotate.

Aproape în același timp, P. Zamecnick și M. Hoagland au descoperit că în cursul sintezei proteinelor, aminoacizii marcați cu ^{14}C se leagă temporar de o fractie cu masă moleculară joasă a ARN.

Investigațiile ulterioare au evidențiat faptul că acești ARN, care au fost denumiți inițial "ARN solubili" sau ARNs, sunt de fapt specii de ARNt, adică "adaptori" postulați de F. Crick.

"Dogma centrală" a biologiei moleculare poate fi reprezentată printr-o schemă simplă:



https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Conform acestei scheme, informația genetică din molecula de ADN (existentă în secvența bazelor sale azotate) are două caracteristici:

- pe de o parte se păstrează și se perpetuează prin autoreplicarea ADN (săgeata circulară).
- pe de altă parte, se transmite moleculelor de ARN în procesul de transcripție, când secvența nucleobazelor de pe ADN-ul matriță este copiată în secvența complementară a bazelor din ARNm.

Etapa următoare constă în traducerea informației genetice din secvența bazelor ARNm în secvența aminoacizilor din proteine.

IV.3.5.1. Codul genetic

În biosinteza proteinelor, codul genetic este un sistem natural de corespondență între cele patru nucleotide posibile ale ADN-ului (fiecare compusă din cele patru nucleobaze azotate normale: A, G, C, T) și cei 20 de aminoacizi de la care se pot sintetiza proteinele.

Din punct de vedere cibernetic, este vorba în esență de traducerea unui text (gena) scris cu ajutorul unui alfabet din patru "litere" (A, G, C, T) în altul (proteina) care utilizează 20 de "cuvinte" diferite.

Calculele arată că fiecărui aminoacid (fiecărui "cuvânt" din "limbajul proteinelor") îi corespunde o secvență specifică de trei baze azotate din ADN; fiecare din aceste "cuvinte" din trei "litere" din "limbajul ADN-ului" constituie un codon. Cu codul de trei nucleotide, numărul de combinații posibile este de $4^3 = 64$, pentru un total de 20 aminoacizi.

Rezultă că, din punct de vedere genetic, același aminoacid poate fi codificat din mai multe triplete. Aceste triplete constituie codonii de pe molecula ARNm (tabel nr. IV.13).

Toți cei 64 codoni au fost descifrați: 61 triplete corespund celor 20 de aminoacizi, în timp ce trei triplete codează pentru terminarea lanțului polipeptidic (triplete "nonsens" din tabelul nr. IV.13). Doar Trp și Met sunt codați de câte un singur triplet.

Tabel nr. IV.13

Codul genetic (codonii transportați de ARN mesager)

Nucleotide (prima poziție)	Nucleotide (a doua poziție)				Nucleotide (a treia poziție)
	U	C	A	G	
U	UUU, UUC Phe UUA, UUG Leu	UCU, UCC, UCA, UCG Ser	UAU, UAC Tyr UAA, UAG Nonsens	UGU, UGC Cys UGA Nonsens UGGTrp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG Leu	CCU, CCC, CCA, CCG Pro	CAU, CAC His CAA, CAG Gln	CGU, CGC, CGA, CGG Arg	U C A G

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

continuare

A	AUU, AUC Ile AUG Met	ACU, ACC, ACA, ACG Thr	AAU, ACC Asn AAA, AAG Lys	AGU, AGC Ser AGA, AGG Arg	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG Val	GCU, GCC, GCA, GCG Ala	GAU, GAC Asp GAA, GAG Glu	GGU, GGC, GGGA, GGG Gly	U C A G

În ultimii ani, s-a constatat că la organismele superioare, o mare parte din ADN este noncodificantă, partea codificantă a genomului uman fiind de numai 20% din lungimea sa reală.

Acest fapt a pus în discuție semnificațiile evolutive ale mutațiilor ADN-ului necodificant, care oferă probabil o mai mare mobilitate virtuală a genomului, în comparație cu ideea clasică după care evoluția ADN ar rezulta în esență din acumularea de mutații punctuale (genice) și din transpoziție, accidente și multiplicări cromozomice.

Conform "dogmei centrale", biosinteza proteinelor ar începe cu separarea dublului helix al ADN; un mecanism de control dictează când anume panglicile de ADN separate să acționeze ca matrițe pentru un lanț complementar de ADN sau pentru unul de ARNm. Transcrierea informației de pe panglicile separate de ADN pe lanțuri complementare de ARN are loc numai în prezența ADN-templat și a ARN polimerazei – ADN dependente (IV.3.4.1).

După transcriere urmează traducerea informației și sinteza proteinelor, conform instrucțiunilor primite de la matrița ARNm, purtător de cod genetic. Proteina nou sintetizată conține semnale care o recomandă pentru diferite funcții biologice (hormon, enzimă, proteină structurală).

Genomul uman conține 23 de cromozomi, care constau din ~$3{,}6 \cdot 10^6$ perechi de nucleobaze (față de cromozomii din *Escheria coli*, cu $4 \cdot 10^6$ perechi de baze azotate).

Semnale de începere și de oprire pentru sinteza proteinelor

Biosinteza proteinelor începe întotdeauna de la capătul N-terminal și continuă spre capătul C-terminal al lațului polipeptidic.

În cazul bacteriilor, lanțurile polipeptidice încep cu un aminoacid modificat, formil-metionina (f.Met), transportat de un ARNt inițiator, specific. Acest ARNt specific pentru f.Met recunoaște codul AUG sau, în mai mică măsură, GUG. La eucariote, secvența AUG apropiată de capătul 5' al mleculei de ARNm este de obicei semnalul de start pentru sinteza proteinelor. Acest AUG special este citit de un ARNt inițiator.

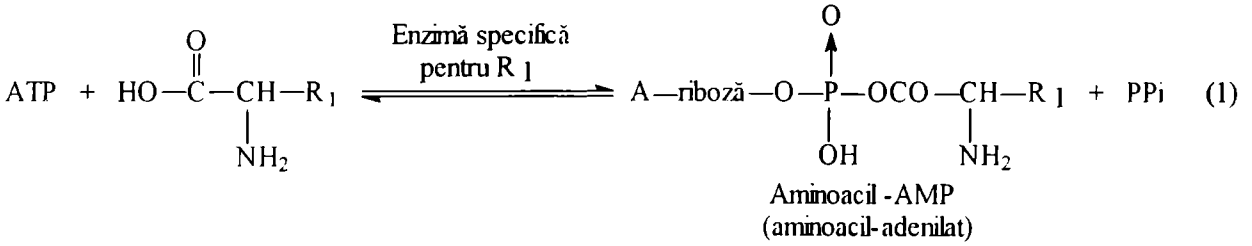
Semnalul de întrerupere a lanțului polipeptidic este indicat de codonii UAA, UAG și UGA care semnalează terminarea lanțului, dar acești codoni nu sunt citiți de un ARNt, ci de proteine numite factori de eliberare.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

IV.3.5.2. Etapele biosintezei proteinelor

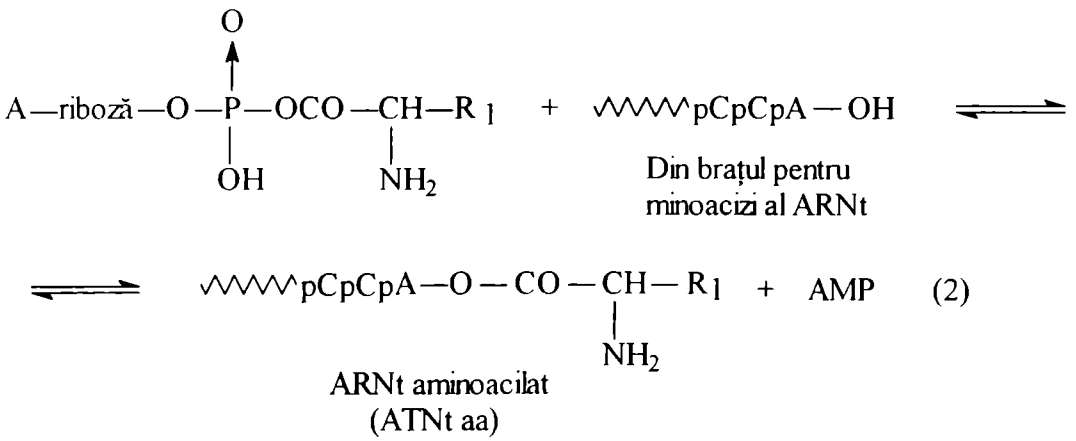
A. Activarea

Enzima care leagă aminoacidul N-terminal de ARNt specific catalizează şi etapa de activare a aminoacidului cu ATP, bogat în energie biologică:



(1)

B. Transferul aminoacidului activat (sub formă de aminoacil-AMP) pe un ARNt specific, are loc în prezenţa aceleiaşi enzime:



(2)

Acest transfer este esenţial, pentru că aminoacizii liberi (neactivaţi) nu pot recunoaşte codonii.

Reacţiile (1) şi (2), care au loc la toţi aminoacizi, utilizează de fiecare dată o enzimă specifică şi un ARNt specific şi continuă până când se formează toţi esterii aminoacilaţi ai ARNt, fiecare cu un anticodon (nodoc) specific pe braţul anticodon al ARNt.

Enzima specifică, care catalizează reacţiile (1) şi (2) a fost denumită iniţial enzimă de activare (P. Zamecnick şi . Hoagland, 1957).

Există pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi naturali câte o asemenea enzimă specifică, denumită aminoacil-ARNt sintetază. Fidelitatea aminoacil-ARNt sintetazelor este legată de înalta lor specificitate; aceste enzime sunt foarte selective atât în recunoaşterea aminoacizilor cât şi a viitorului acceptor (ARNt).

Pe lângă situsurile de sinteză, multe asemenea sintetaze conţin şi situsuri de hidroliză. Situsurile de sinteză îndepărtează aminoacizii nespecifici. Cu alte cuvinte, sintetazele joacă rol de adaptor între cele două "alfabete" fundamentale ale sistemelor biologice.

Reacţiile (1) şi (2), respectiv fosfatarea aminoacizilor şi formarea ARNtaa sunt reversibile, pentru că energiile libere de hidroliză ale legăturilor formate în aminoacid-adenilat şi în ARNtaa sunt comparabile cu cea de la hidroliza ATP. Reacţia este completată prin prezenţa pirofosfatazei anorganice, care catalizează hidroliza PPi generat în etapa (1).

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Celulele pot avea cel puțin câte o aminoacil-ARNt sintetază pentru fiecare din cei 20 de aminoacizi naturali.

S-au caracterizat peste 100 de asemenea enzime, care diferă prin patru tipuri diferite de subunități structurale (α_1, α_2, α_4 și $\alpha_2\beta_2$). Ele sunt compuse din 334 – 1000 resturi de asemenea subunități. Pentru același aminoacid, sintetazele specifice se deosebesc considerabil prin secvențele lor, de la un organism la altul.

C. Formarea legăturii peptidice

Legătura peptidică se formează pe ribozom, cu participarea ARNr. Particulele de ribozomi, formate pe scheletul de ARNr, au formă de pară, cu un diametru de ~20nm.

Înaintea sintezei proteinice, ARNm interacționează cu ribozomul. Imediat după formarea sa, complexul ARNm – ribozom intră în contact cu diferite molecule de ARNtaa, care se găsesc în imediata sa vecinătate. Dacă bucla anticodon (din brațul anticodon al ARNt) expusă este complementară codonului (tripletului specific) al ARNm stabilizat pe ribozom, se va forma un triplet de perechi de baze asociate prin legaturi de hidrogen. Deși secvența următoare nu a fost încă pe deplin elucidată, se pare că bucla ARNt care conține pseudouridina (din brațul TΨC) se leagă de ribozom și stabilizează ulterior complexul ternar ARNtaa-ARNm-ribozom.

În cazul în care doar una sau două nucleotide pot să se împerecheze, asocierea nu va fi suficient de puternică pentru a permite buclei din brațul TΨC al ARNt să stabilizeze complexul; în acest caz, ARNtaa "rău" se va îndepărta prin difuzie și va fi înlocuit cu un altul, până când se va realiza o împerechere corectă.

D. Elongarea lanțului

În această etapă, următorul codon al ARNm (adică alte trei nucleotide plasate în proximitate) vine într-o poziție favorabilă pentru a reacționa cu nodocul (anticodonul său complementar) de pe un alt ARNt. Când se realizează asemenea alinieri, grupa –COOH a primului aminoacid participă la formarea unei legături peptidice cu grupa $-NH_2$ liberă a ARNtaa recent introdus. Această reacție (catalizată enzimatic) eliberează primul aminoacid de ARNt-ul său (într-un mod încă neelucidat) și difuzează mai departe, abandonând un complex dipeptidil-ARNt-ARNm-ribozom. În continuare, ribozomul deplasează ARNm suficient pentru a aduce noul codon (al treilea) într-o poziție în care sa poată interacționa cu propriul său nodoc (anticodon) de pe următorul ARNtaa.

O schemă simplificată a acestui proces este ilustrată în fig. IV.17.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

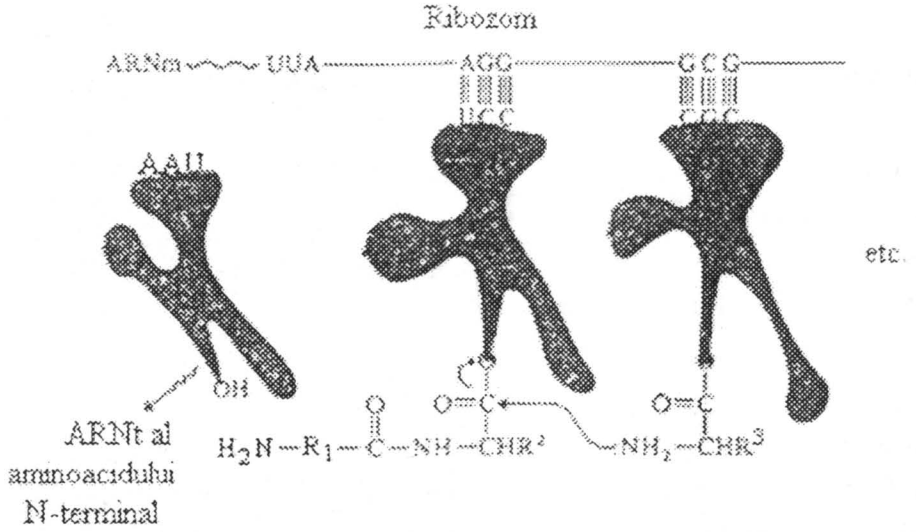


Fig. IV.17 Diagrama schematică a biosintezei peptidice (fragment)

E. Terminarea lanțului

Elongarea lanțului peptidic se repetă până când un semnal de la nivelul ARNm indică faza terminării lanțului, când se opreşte sinteza şi se eliberează proteina finală, care va fi apoi utilizată de organism în diferite scopuri.

Terminarea lanțului proteinic este semnalată de unele secvențe de baze azotate de pe ARNm. Recunoaşterea semnalului de terminare se face cu ajutorul unor proteine numite "factori de eliberare R", care se leagă de ribozomul functional, determinând ruperea legăturii esterice dintre ARNt şi lanțul polipeptidic.

O trăsătură importantă a expresiei genetice la procariote este aceea că transcrierea şi translația sunt strâns legate în spațiu şi timp, datorită duratei scurte de viață a organismelor. Mai mulți ribozomi pot transla simultan o moleculă de ARNm, ceea ce creşte eficiența utilizării moleculei de ARNm.

Grupul de ribozomi legați la o moleculă de ARNm se numeşte polizom (sau poliribozom). Ribozomii din grup operează independent, fiecare sintetizând un lant polipeptidic complet. Densitatea maximă de ribozomi pe ARNm la procariote este de ~1 ribozom la 8 nucleotide.

La eucariote, sinteza proteinică se aseamănă în linii mari cu cea de la procariote, dar există şi deosebiri, ribozomii fiind mai mari.

Polizomii care sintetizează hemoglobina (din 145 molecule de aminoacizi) constau din 5 ribozomi legați la o moleculă de ARNm.

O consecință a reglării sintezei specifice a proteinelor de către ARNm după matrițele ADN este şi inducția enzimelor.

Celulele de *E. coli* pot sintetiza ~3000 de polipeptide diferite, existând enorme variații în cantitățile acestora.

Diferite proteine ribozomale pot prezenta fiecare peste 10.000 de copii per celulă, pe când câteva proteine regulatoare (enzime) sunt produse în mai puțin de 10 copii/celulă.

Enzimele constitutive sunt sintetizate cu viteză mai mult sau mai puțin constantă. Enzimele adaptive (ca cele care metabolizează lacatoza: lactaza, galactozid-permeaza sau lactozo-permeaza) sunt sintetizate cu viteze care variază în funcție de condițiile din celulă, cum

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ar fi prezența unei cantități variabile de substrat specific (în cazul exemplului de mai sus, lactoză). În acest caz, substratul (lactoza) joacă rol de inductor.

Utilizând valori cunoscute ale energiilor legăturilor de hidrogen, teoreticienii au calculat că, dacă codul genetic ar fi un dublet sau un cuadruplet, viața așa cum o cunoaștem pe planeta noastră nu ar fi posibilă. Astfel, forța de atracție dintre două perechi de baze legate prin legături de hidrogen n-ar permite moleculei voluminoase de ARNt să rămână un timp suficient de lung pe ribozom, pentru ca formarea legăturii peptidice să fie posibilă.

Din contră, patru perechi de baze vor da naștere la legături atât de puternice, încât sinteza proteinelor ar dura luni de zile. În realitate, măsurătorile au arătat că viteza sintezei proteinice într-o celulă vie decurge cu asamblarea a doi aminoacizi pe secundă.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

BIBLIOGRAFIE

1) Allinger, N. L.; Cava, M. P.; de Jongh, D.C.; Johnson, C. R.; Lebel, N. A. şi Stevens. C L. – Chimie Organique, Mc Graw-Hill, 1983.

2) Ardelean, A. M. şi Tripşa, M. F. – Mecanisme de transport în sistemele biologice, Foreign Language Press Group – România, 2001.

3) Avram, M. – Chimie Organică vol II, ed. a Iia, Editura Zecasin, Bucureşti, 1995.

4) Braun, J. – Ghid clinic, Ediția a 5a, Editura Medicală, Bucureşti, 1997.

5) Buican, D. – Dicționar de Biologie (Larousse), Editura Univers Enciclopedic, Bucureşti, 2001.

6) Ciurdaru, V. – Biochimie – procese metabolice în organismele animale, Editura Albastră, Cluj, 1997.

7) Constantinidi, M.; Pănoiu, L. şi Marinescu, Z. – Farmacologie, Editura Universul, Bucureşti.

8) Cucuianu, M.; Crîsnic, I. şi Pleşca-Manea, L. – Biochimie clinică, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1998.

9) Devlin, M. Th., Ph.D. – Textbook of Biochemistry with clinical correlations, J. Wiley and Sons, New York, 1982.

10) Dumitru, I. F. şi Iordăchescu, D. – Introducere în enzimologie, Editura Medicală, Bucureşti, 1981.

11) Fessenden, R. J. şi Fessenden, J. S. – Organic Chemistry Third Edition, Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove, California, 1986.

12) Gârban, Z. – Tratat elementar de Biochimie vol. I/partea a 2a, Editura Mirton, Timişoara, 1996.

13) Gioabă, A. – Biochimie, Centrul de multiplicare IPB, 1984.

14) Gioabă, A. şi Popa, E. – Biochimie structurală partea I, Editura Universității din Bucureşti, 2001.

15) Ifrim, S. – Substanțe biologic active, Editura Tehnică, Bucureşti, 1997.

16) Irimie, F. D. – Elemente de Biochimie, Editura Erdélyi Híradó, Cluj, 1998.

17) Lehninger, A. L. – Biochimie vol. I, Editura Tehnică, Bucureşti, 1986.

18) Loewry, A. G. şi Siekevitz, Ph. – Cell Structure and Function, 2nd Edition, Holt Rinehart and Winston, 1970.

19) Métais, R.; Agneray, J.; Férand, G.; Fruchart, J.-Ch.; Jardillier, J. C.; Revol, A.; Siest, G. şi Stahl, A. – Biochimie clinique, Simep Edition, 1977-1979, Villeurbanne, France.

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

20) Módy, E.; Funduc, I.; Alexandrescu, R. şi Dobreanu, M. – Biochimie Clinică (Patochimie), Editura All Educational, 2000.

21) Moldoveanu, E.; Neagu, M. şi Popescu, L. M. – Dicţionar de Biochimie şi Biochimie moleculară, Editura Medicală, Bucureşti, 2001.

22) Neamţu, G. – Biochimie vegetală, Editura Ceres, Bucureşti, 1981.

23) Nenițescu, C. D. – Chimie Organică vol. I şi vol. II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.

24) Olinescu, A. – Imunologie, Editura Didactică şi Pedagogică R.A., Bucureşti, 1995.

25) Păun, L. – Bioterorismul şi armele biologice, Editura Amaltea, Bucureşti, 2003.

26) Popa, E. – Biocatalizatori imobilizaţi vol. I, Editura Universităţii din Bucureşti, 1996.

27) Popa, E. – Biocatalizatori imobilizaţi vol. II, Editura Universităţii din Bucureşti, 1997.

28) Scriban, R. (coordonateur) – Biotechnologie ed. IV, Ed. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 1993.

29) Viesturs, U.; Šmite, I. şi Žileviča, A. – Biotehnologie, Editura Ceres, Bucureşti, 1991.

30) Voet, D. şi Voet, J. G. – Biochemistry, John Wiley and Sons Inc., 1990.

VERIFICAT
2017

BIBLIOTECA
CENTRALĂ
UNIVERSITARĂ "CAROL I"
BUCUREŞTI

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 1256/2004 la
Tipografia Editurii Universității din București

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

DE SPIRITU ET ANIMA
Biblioteca
Centrală
Universitară
CAROL I

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro

ISBN 973-575-927-6

Lei 150000

https://biblioteca-digitala.ro / https://unibuc.ro